

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Entwicklung und Einsatz eines In-vitro-Ischämiemodells zur
Untersuchung zellulärer Pathomechanismen
der Klauenreihe des Rindes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Katharina Lübke
aus Braunschweig

Leipzig, 2015

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Christoph Mülling

Gutachter: Prof. Dr. Christoph Mülling, Veterinär-Anatomisches Institut,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Alois Boos, Veterinär-Anatomisches Institut,
Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich

Tag der Verteidigung: 05.05.2015

Meinen Eltern

Inhalt	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Die Klaue.....	3
2.1.1 Definition der Rinderklaue	3
2.1.2 Die Epidermis	3
2.1.3 Die dermo-epidermale Verbindung.....	6
2.1.4 Die terminale Differenzierung in der Epidermis	7
2.1.4.1 Keratinisierung und Verhornung	7
2.1.4.2 Membrane coating granules und membrane coating material ...	8
2.1.4.3 Keratine	8
2.1.4.4 Cornified cell envelope	10
2.1.4.5 Die Keratohyalin granula und ihre Keratinfilament-assoziierten Proteine	10
2.1.5 Die Dermis (Lederhaut)	12
2.2 Klauenrehe: Krankheitsbild und aktueller Wissensstand.....	13
2.2.1 Die entzündlich bedingte Klauenrehe	14
2.2.2 Die subklinische Klauenrehe oder claw horn disruption	15
2.2.3 Pathophysiologie der claw horn disruption	16
2.2.4 Risikofaktoren.....	18
2.2.4.1 Endogene Faktoren	19
2.2.4.1.1 Peripartaler Zeitraum.....	19
2.2.4.1.2 Klauenform und Körperkondition	19
2.2.4.1.3 Verhalten der Rinder	20
2.2.4.1.4 Vasoaktive Substanzen.....	20
2.2.4.1.5 Weitere endogene Faktoren	21
2.2.4.2 Exogene Faktoren	21
2.2.4.2.1 Fütterung.....	21
2.2.4.2.2 Haltungsbedingungen und Kuhkomfort	22
2.2.4.2.3 Mechanische Faktoren	23

2.3	Einsatz von In-vitro-Modellen epidermaler Keratinozyten.....	24
2.3.1	Keratinozyten in vitro als Forschungsgegenstand in der Zellkultur	24
2.3.2	Einflüsse auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Keratinozyten.....	26
2.3.2.1	Der extrazelluläre Kalziumgehalt	27
2.3.2.2	Zellgröße und Konfluenz	28
2.3.2.3	Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration.....	28
2.3.2.4	Abhängigkeit von der Glukoseversorgung	30
2.3.2.5	Autokrine Beeinflussung	30
2.3.2.6	Weitere Einflüsse	31
2.3.3	Oxygen glucose deprivation (OGD)	31
2.3.4	Relevanz eines In-vitro-Ischämiemodells in der heutigen Klauenrehe- forschung.....	33
3	Materialien.....	35
3.1	Zellen.....	35
3.2	Medien, Medienzusätze und Lösungen	35
3.2.1	Medien	35
3.2.2	Lösungen und Puffer.....	36
3.2.3	Verwendete Antikörper	41
4	Methoden	42
4.1	Isolation	42
4.2	Kultivierung der Keratinozyten.....	43
4.3	Subkultivierung	43
4.4	Kryokonservierung.....	43
4.4.1	Einfrieren der Zellen.....	43
4.4.2	Auftauen der Zellen.....	44
4.5	Immunzytochemische Charakterisierung.....	44
4.5.1	Immunzytochemische Färbung.....	45
4.6	In-vitro-Ischämiemodell.....	46
4.6.1	Durchführung des In-vitro-Ischämiemodells.....	46
4.6.2	Gliederung der Ischämieversuche	47

4.7	Vitalitätstests	47
4.7.1	Prinzip des LDH-Tests.....	47
4.7.2	Durchführung des LDH-Tests.....	48
4.7.3	Prinzip des MTT-Tests	48
4.7.4	Durchführung des MTT-Tests.....	48
4.8	Nachweis der Expression terminaler Differenzierungsmarker.....	49
4.8.1	Herstellung der Zelllysate	49
4.8.2	Proteinbestimmung mittels BCA Assay	49
4.8.3	SDS-PAGE.....	50
4.8.3.1	Probenvorbereitung	50
4.8.3.2	Durchführung der SDS-PAGE	51
4.8.4	Western Blot.....	52
4.8.5	Immunodetektion.....	52
4.9	Dokumentation	53
4.10	Statistische Auswertung.....	54
5	Ergebnisse	55
5.1	Kultivierung der bovinen Keratinozyten	55
5.1.1	Isolierung und Kultivierung	55
5.1.2	Immunzytochemische Charakterisierung.....	56
5.2	Bestimmung der Zytotoxizität und Zellviabilität der Keratinozyten nach OGD-Exposition	57
5.2.1	Pilotstudie 1: Normoxie vs. OGD.....	57
5.2.2	Pilotstudie 2: Zellviabilität bei Sauerstoffkonzentration von 5% O ₂	59
5.2.3	Hauptstudie	61
5.2.3.1	Kurzzeitanalyse über 96 Stunden.....	61
5.2.3.2	Langzeitanalyse über drei Wochen	70
5.3	Einfluss ischämischer, hypoxischer und glukosefreier Bedingungen auf das Differenzierungsverhalten der Keratinozyten	77
5.3.1	Involukrin-Expression	78
5.3.2	Lorikrin-Expression.....	79
6	Diskussion.....	81

6.1	Beurteilung der Methodik des etablierten In-vitro-Ischämiemodells.....	81
6.1.1	Das In-vitro-Ischämiemodell	81
6.1.2	Wahl der Versuchsbedingungen und -dauer.....	82
6.1.3	Vitalitätsuntersuchungen.....	84
6.1.3.1	LDH-Assay	85
6.1.3.2	MTT-Assay	86
6.2	Beurteilung der Effekte hypoxischer, hypoglykämischer und ischämischer Bedingungen auf die Keratinozyten.....	88
6.2.1	Effekt eines Sauerstoffmangels auf die Zellviabilität der Keratinozyten	88
6.2.2	Effekt eines Glukoseentzugs auf die Zellviabilität der Keratinozyten ..	91
6.2.3	Effekt einer Ischämie auf die Zellviabilität der Keratinozyten	95
6.3	Verändertes Differenzierungsverhalten infolge ischämischer, hypoxischer und hypoglykämischer Bedingungen.....	98
6.4	Ausblick	101
7	Zusammenfassung	103
8	Summary	105
9	Literaturverzeichnis	107
10	Anhang	116
10.1	Material	116
10.1.1	Verwendete Reagenzien	116
10.1.2	Verwendete Reagenzien für die Immunzytochemie	116
10.1.3	Proteindetektion	117
10.2	Verbrauchsmaterialien	119
10.3	Geräte	120

Abkürzungen

6-Well	Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen
12-Well	Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen
96-Well	Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen
Abb.	Abbildung
α	Alpha
β	Beta
C	Celsius
CE	Cornified cell envelope
CHD	Claw horn disruption
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
FKS	Fetales Kälberserum
GE	Glukoseentzug
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
HIF	Hypoxia inducible factor
Hoechst	Bisbenzimid H 33342 trihydrochloride
HYP	Hypoxie
INV	Involukrin
kDa	Kilodalton
KFAP	Keratinfilament-assoziierte Proteine
KGF	Keratinocyte growth factor
KHG	Keratohyalin granula
KON	Kontrolle
LDH	Laktatdehydrogenase
LM	Lichtmikroskop
LOR	Lorikrin
mA	Milliampere
MCG	Membrane coating granule
MCM	Membrane coating material
mg	Milligramm

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
min	Minute
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
mM	Millimol
mol/L	Mol pro Liter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
OGD	Oxygen glucose deprivation
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PI	Proteinase-Inhibitor
s.	Siehe
s.o.	Siehe oben
SARA	Subakute Pansenazidose
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis
SPR	Small proline-rich protein
S/T PI	Serin/Threonin Phosphatase Inhibitor
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung (+ 0,1% Tween 20)
TG	Transglutaminase
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
TPI	Tyrosin Phosphatase Inhibitor
U/mL	Einheiten pro Milliliter
U/mg	Einheiten pro Milligramm
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Watt
z.B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

Klauenerkrankungen sind für die Rinderhaltung von sehr großer Bedeutung, da sie zu einer Beeinträchtigung des Wohlbefindens sowie einer eingeschränkten Leistungsfähigkeit der Tiere führen. Sie bewirken infolge schmerzhafter Prozesse, einer verminderten Milchleistung, einer herabgesetzten Futterverwertung, einer reduzierten Reproduktionsrate sowie erhöhter Tierabgänge massive wirtschaftliche Einbußen. Klauenerkrankungen wie Klauengeschwüre, die White Line Disease, die ‚dropped sole‘ (Deformationen der Sohlenoberfläche) und die Doppelsohlenbildung entstehen meist sekundär im Rahmen der sogenannten subklinischen Klauenrehe (LISCHER und OSSENT 2002, MÜLLING und LISCHER 2002) oder ‚claw horn disruption‘ (CHD) (HOBLET und WEISS 2001) infolge einer durch diese verursachten pathophysiologischen Gewebeschädigung (LISCHER und OSSENT 2002, MÜLLING und LISCHER 2002). Die CHD ist die am häufigsten vorkommende Klauenreheform und ist nicht durch das Auftreten primärer Entzündungsreaktionen geprägt, wie sie bei der klassischen Klauenrehe, der Pododermatitis aseptica diffusa, auftreten (HOBLET und WEISS 2001, VERMUNT 2007). Dahingegen zeichnet sie sich durch eine Störung der Keratinisierung und somit der Hornproduktion aus (GREENOUGH 2007a). Die Initialphase der Erkrankung mit den pathophysiologischen Veränderungen bleibt jedoch meist klinisch unerkannt, sodass erst Wochen später die Veränderungen des Klauenhorns sichtbar werden (HOBLET und WEISS 2001, LISCHER und OSSENT 1994, MÜLLING und LISCHER 2002). Auslösende Risikofaktoren der multifaktoriellen CHD lassen sich zum einen in endogene Faktoren, wie Körperkondition, Klauenform und -qualität, und zum anderen in exogene Faktoren, wie Fütterung, Haltung und Tierverhalten, unterteilen. Somit ist die Abgrenzung einer individuell bedingten CHD von einer durch das Herdenmanagement bedingten CHD möglich (HOBLET und WEISS 2001, TARLTON et al. 2002).

Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die pathophysiologischen Grundlagen der Klauenrehe noch immer nicht vollständig geklärt, sodass zahlreiche Hypothesen zu den Veränderungen der dermalen Mikrozirkulation und den daraus resultierenden pathophysiologischen Veränderungen existieren (BERGSTEN 2003, HOBLET und WEISS 2001, MÜLLING und LISCHER 2002). So bewirkt die resultierende Ischämie in den lebenden Epidermisschichten eine Störung der epidermalen Zellproliferation und -differenzierung, die einerseits mit einer Schädigung der dermo-epidermalen Verbindung (GREENOUGH 2007a, OSSENT und LISCHER 1998) sowie andererseits mit der Ausbildung eines minderwertigen Horns und einer gesteigerten Hornproduktion einhergeht (GREENOUGH 2007a). Um die Folgen einer epidermalen Ischämie, hervorgerufen durch eine veränderte dermale Mikrozirkulation, auf die

Keratinisierung und Zelldifferenzierung der Keratinozyten und damit ihre Bedeutung für das frühe Stadium der Pathogenese der CHD untersuchen zu können, kommt den In-vitro-Modellen eine große Bedeutung zu (MÜLLING und LISCHER 2002). In der Humanmedizin werden In-vitro-Ischämiemodelle zur Untersuchung eines gleichzeitigen Sauerstoff- und Glukoseentzugs bereits in der Schlaganfallforschung (MELONI et al. 2011) angewendet. Ebenso werden sie zur Untersuchung eines Sauerstoff- oder eines Glukoseentzugs an Keratinozyten zur Untersuchung molekularbiologischer Mechanismen der Epidermis eingesetzt (STRASESKI et al. 2009). Dahingegen sind In-vitro-Ischämiemodelle für die Rinderklaue bisher nicht vorhanden. Solche Ischämiemodelle ermöglichen zum einen die Untersuchung molekularbiologischer Mechanismen der Keratinozyten während der Zelldifferenzierung, da sie bei ihrem Verlauf in die oberen Zellschichten einer physiologischen Hypoxie ausgesetzt werden (STRASESKI et al. 2009). Zum anderen können die pathophysiologischen Vorgänge infolge einer gestörten dermalen Mikrozirkulation mit nachfolgender Ischämie untersucht werden, die zu einer veränderten Proliferation und Differenzierung der epidermalen Keratinozyten führen (NGO et al. 2007). Daher stellt die Etablierung eines In-vitro-Ischämiemodells auf der Basis boviner Keratinozyten aus der Klauenepidermis das Ziel der vorliegend dokumentierten Forschungsarbeit dar. Mit Hilfe dieses Modells sollen weiterhin die pathophysiologischen Zellreaktionen auf eine Ischämie, eine Hypoxie sowie einen Glukoseentzug analysiert werden. Ein weiteres Ziel ist die Detektion eines veränderten Expressionsmusters terminaler Differenzierungsmarker infolge ischämischer, hypoxischer und hypoglykämischer Bedingungen.

Zusammenfassend verfolgt die vorliegende Arbeit folgende Zielstellung:

- I. Die Etablierung eines In-vitro-Ischämiemodells basierend auf bovinen Keratinozyten aus der Klauenepidermis
- II. Die Untersuchung pathophysiologischer Zellreaktionen der Keratinozyten auf ischämische, hypoxische und hypoglykämische Bedingungen
- III. Die Analyse des Einflusses ischämischer, hypoxischer und hypoglykämischer Konditionen auf das Differenzierungsverhalten der Keratinozyten

2 Literaturübersicht

2.1 Die Klaue

2.1.1 Definition der Rinderklaue

Als Zehenendorgan wird im Allgemeinen die von modifizierter und stark verhornter Haut umgebene Gliedmaßenspitze samt den Strukturen des Bewegungs- und Stützapparates bezeichnet. Dabei hat sich bei den Paarhufern als Anpassung an den Zehenspitzengang die Klaue entwickelt (MAIERL und MÜLLING 2004, BUDRAS und WÜNSCHE 2002, HOHMANN 1902). Nach BUDRAS und WÜNSCHE (2002) handelt es sich bei der Klaue im engeren Sinn um die modifizierte intakte Epidermis und den daraus hervorgehenden Klauenschuh. Die Hauptklauen werden von der dritten und vierten Zehe gebildet und stellen die Stützzehen dar. Hinzu kommen die beiden Afterklauen, die reduzierten Klauen der zweiten und fünften Zehe. Diese sind lediglich bindegewebig mit der Gliedmaße verbunden und setzen beim Fuß nicht auf (MAIERL und MÜLLING 2004, BUDRAS und WÜNSCHE 2002).

Die modifizierte Hautschicht der distalen Gliedmaße lässt eine anatomische Unterteilung in Schichten und Segmente zu (WILKENS 1964). Der behaarten Haut entsprechend lassen sich von innen nach außen folgende drei Schichten unterscheiden: 1. die Tela subcutanea, auch Unterhaut genannt, 2. die Dermis (Corium), die Lederhaut, und schließlich 3. die Epidermis, die Oberhaut (BUDRAS und WÜNSCHE 2002). Weiterhin kann anhand der Art der Hautmodifikation und der Gestaltung der Lederhautoberfläche eine weitere Segmentierung vorgenommen werden. Daraus resultieren 1. das Saumsegment, auch als Limbus bezeichnet, 2. das Kronsegment, Corona, 3. das Wandsegment oder Paries, 4. das Sohlensegment, Solea, und schließlich 5. das Ballensegment, Torus ungulae (MAIERL und MÜLLING 2004, BUDRAS und WÜNSCHE 2002).

2.1.2 Die Epidermis

Als funktionelles Organ umgibt das Integumentum commune, die allgemeine Körperdecke, den gesamten Organismus und bewahrt diesen vor mechanischen, thermischen, biologischen und chemischen Einflüssen. Zudem findet hier die Regulation des Wasser- und Wärmehaushaltes statt. Trotz der Vielfältigkeit dieses Organs lässt sich die Haut grundsätzlich 1. in die Epidermis, die Oberhaut und somit die äußerste Schicht des Organismus, 2. in die Dermis, die Lederhaut, und 3. in die unterlagerte Tela subcutanea, die Unterhaut, gliedern (ECKHART et al. 2013).

Um den ausgeprägten mechanischen Kräften während der Belastung standzuhalten, entstehen infolge von Differenzierung und Verhornung der epidermalen Zellen Modifikationen der Epidermis (LIEBICH 2004). Ein Beispiel dafür ist die bovine Klaue, deren Epidermis mit bis zu 60 Schichten noch lebender Keratinozyten und mit einem bis zu 10 mm dicken Stratum corneum, der Hornzellschicht, sehr ausgeprägt ist (MÜLLING 2000).

Generell handelt es sich bei der Epidermis um ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel, in dem Keratinozyten mit 90% den größten Anteil der Zellen repräsentieren (LULEVICH et al. 2010). Während ihrer Migration durch die Epidermis durchlaufen die Zellen die Phasen der Zellteilung, der Differenzierung und der Verhornung (MILLS et al. 2009, HOUBEN et al. 2007). Histologisch lassen sich in der Epidermis von innen nach außen folgende vier Schichten unterscheiden: als proliferierende Schicht das Stratum basale, darauffolgend das Stratum spinosum, die Stachelzellschicht, das Stratum granulosum oder Körnerzellschicht und zu guter Letzt das Stratum corneum, die Hornzellschicht (LI 2013).

Da die Epidermis keine eigene Blutversorgung besitzt, werden die drei innersten Schichten, die für die ‚lebende‘ Epidermis stehen, per Diffusion über das mikrovaskuläre Gefäßsystem der darunterliegenden Dermis versorgt (HIRSCHBERG et al. 2001, MÜLLING et al. 1999). Als Folge entwickelt sich in der Epidermis mit zunehmender Entfernung zum mikrovaskulären System eine leichte Hypoxie (BEDOGNI et al. 2005).

Die innerste Schicht der Epidermis wird durch das einschichtige **Stratum basale** gebildet und durch die Basalmembran von der darunterliegenden Dermis getrennt (LI 2013, VARKEY et al. 2013). Auf ihrer basalen Seite stehen die epidermalen Zellen über Hemidesmosomen mit der Basalmembran in Verbindung. Dies gewährleistet eine hohe mechanische Stabilität gegenüber externen mechanischen Kräften (HOUBEN et al. 2007). Charakteristisch für das Stratum basale sind die proliferierenden Keratinozyten, die die Keratine 5 und 14 exprimieren (LI 2013). Diese entstammen den epidermalen Stammzellen, die für eine hohe Mitoserate und damit für einen ständigen Zellnachschub der Epidermis sorgen (HOUBEN et al. 2007). Stammzellen bilden infolge von Zellteilung entweder weitere Stammzellen oder die sogenannten transit-amplifying cells, die nach mehrmaliger Zellteilung die Stammzellnische verlassen und das Programm der terminalen Differenzierung beginnen (HOUBEN et al. 2007, WATT 2001). Obwohl Stammzellen eine hohe Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, müssen sie sich nur selten teilen, um in intakter Epidermis ausreichend Zellen für die terminale Differenzierung zu gewährleisten. Transit-amplifying cells hingegen besitzen nur eine geringe Fähigkeit zur Selbsterneuerung, durchlaufen jedoch wiederholt den Zellzyklus (WATT 2001).

Auf ihrem Weg zur Oberfläche gelangen die epidermalen Zellen als Nächstes in das mehrschichtige **Stratum spinosum**, die Stachelzellschicht, deren Charakteristikum die beginnende Keratinisierung der Zellen ist (LI 2013). Sie zeigen hier eine Variabilität in ihrer Gestaltung, die von längsoval in den unteren Zelllagen (MÜLLING 1993) bis hin zu abgeflacht und länglich mit pyknotischen Zellkernen in den oberen Lagen reicht (MÜLLING 2000). Die Stachelzellen haben ihre Fähigkeit zur Proliferation eingebüßt und die Expression der Zytokeratine 5 und 14 herunterreguliert. Dafür werden nun die Zytokeratine 1 und 10 exprimiert (LI 2013). Die Verbindung zu den benachbarten Zellen wird über Desmosomen gewährleistet (MÜLLING 2000), in denen Intermediärfilamente, wie hier die Zytokeratinfilamente, inserieren und ein dreidimensionales Zytoskelett ausbilden. So wird einerseits für die mechanische Stabilität gesorgt, andererseits aber auch die Flexibilität der Epidermis gewährleistet. Das Auftreten von Zytokeratinfilamenten, von den mit ihnen assoziierten Proteinen (BRAGULLA und HOMBERGER 2009) und von membrane coating granules sind wichtige Merkmale dieser Zellschicht (MÜLLING und BUDRAS 1998).

Allgemein folgt nun in der Epidermis das mehrschichtige **Stratum granulosum**. Als besonderes Merkmal der bovinen Klaue wird das Stratum granulosum nur dort gebildet, wo das sogenannte weiche Horn produziert wird: regelmäßig im Saumsegment, vereinzelt im proximalen Ballen- und in Teilen des Wandsegmentes. Im Stratum granulosum findet ein weiterer degenerativer Zellumbau statt. Die abgeflachten, den Spinosazellen ähnelnden Zellen (FÜRST 1992) werden durch Karyopyknose (BUDRAS et al. 1996) und durch im Zytoplasma eingeschlossene Keratohyalin granula und Keratinfilamentbündel charakterisiert (LI 2013, MÜLLING 1993). Ein weiteres Kennzeichen ist die Expression von Proteinen der terminalen Differenzierung, wie beispielsweise Involukrin, Lorikrin und Filaggrin (LI 2013). Trotz der beginnenden Zelldegeneration bleiben die desmosomalen Zellverbindungen bestehen (HOUBEN et al. 2007).

Das **Stratum corneum** stellt die Grenzfläche zur Umwelt dar und wirkt so als eine elementare Barriere gegen äußere Einflüsse, Infektionen und Wasserverluste (PROKSCH et al. 2008). Die Form des dermalen Papillarkörpers bestimmt die charakteristische Architektur des Hornes. So entstehen über den dermalen Papillen die Hornröhrchen und über den Lederhautblättchen die Hornblättchen (MAIERL und MÜLLING 2004). Die Hornröhrchen bestehen aus einem Cortex, der Rinde, und einer Medulla, dem Röhrchenmark (GREENOUGH 2007b). Die Röhrchenrinde wird aus den peripapillären Epidermiszellen gebildet, die an der Papillenbasis entstehen (MAIERL und MÜLLING 2004) und das Röhrchenmark konzentrisch umgeben (GREENOUGH 2007b). Sie werden verhältnismäßig lange durch das dermale Gefäßsystem per Diffusion versorgt, sodass ein hochwertiges Horn gebildet wird

(MAIERL und MÜLLING 2004). Das Röhrchenmark wird aus den suprapapillären Epidermiszellen gebildet, die lediglich temporär und zunehmend schlechter per Diffusion versorgt werden und so aufgrund der sehr kurzen Verhornungszeit ein weiches und brüchiges Horn ausbilden. Die Hornröhrchen sowie die Hornblättchen werden durch das Zwischenröhrchenhorn, gebildet durch die interpapillären Zellen, verbunden (MAIERL und MÜLLING 2004).

2.1.3 Die dermo-epidermale Verbindung

Besondere Beachtung muss der dermo-epidermalen Verbindung als einer Kommunikationsfläche zwischen der Epidermis und der darunterliegenden Dermis geschenkt werden. Ein spezifisches Merkmal der dermo-epidermalen Verbindung ist die Förderung der mechanischen Stabilität durch die Ausbildung der dermalen Papillen und Blättchen. Diese übertragen die auf das Gewebe wirkenden Zug- und Druckspannungen von der Dermis über die Verbindungszone auf die noch lebenden Epidermiszellen. Unterstützung erhalten sie durch in der Basalmembran ausgebildete Hemidesmosomen, Verankerungsfibrillen und das dichte Kollagenfibrillennetz. Weitere wichtige Aufgaben der dermo-epidermalen Verbindung sind zum einen die nutritive Versorgung der Epidermis und zum anderen der Signalaustausch zwischen der Dermis und den noch lebenden Epidermiszellen (MÜLLING und BUDRAS 2002). Die Signalübertragung zwischen Dermis und Epidermis wird auch als dermo-epidermaler ‚cross-talk‘ bezeichnet und erfolgt durch mechanische und biochemische Stimuli, wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Somit können die Proliferation und Differenzierung mitotisch aktiver Zellen der lebenden Epidermis reguliert werden (GREENOUGH 2007b, MILLS et al. 2009, VARKEY et al. 2013).

Die Basalmembran, Membrana basalis, stellt die Verbindung und funktionelle Trennung zwischen den Keratinozyten der Epidermis und den Fibroblasten der Dermis dar (BEHRENS et al. 2012, VARKEY et al. 2013). Sie wird aus einer Lamina densa, einer Lamina lucida und einer Lamina fibroreticularis aufgebaut (MERKER 1994). Wichtige Strukturproteine der Basalmembran sind Glykoproteine wie Laminin und Nidogen, Proteoglykane wie Perlecan und Kollagene, z.B. vom Typ I, III, IV und VII, die sich zu einem Netzwerk formieren und somit eine Barriere zwischen Epidermis und Dermis bilden (VARKEY et al. 2013). Das Kollagen Typ VII der Basalmembran liegt in Form von Fibrillen vor und dient der Verankerung der Basalmembran mit der Dermis (VARKEY et al. 2013). Die Verankerung der basalen Zellen der Epidermis mit der Basalmembran hingegen wird über Hemidesmosomen erreicht. Diese stellen die Verbindung der Keratinfilamente mit den Transmembranproteinen her, zu denen Integrin und Kollagen Typ XVII zählen (BREITKREUTZ et al. 2013).

Eine besondere Rolle kommt der Basalmembran in der Geweberegeneration und -rekonstruktion zu, da sie die Wiederherstellung von defektem Gewebe ermöglicht (BREITKREUTZ et al. 2013) und außerdem als Reservoir für Wachstumsfaktoren und Zytokine dient (VARKEY et al. 2013).

2.1.4 Die terminale Differenzierung in der Epidermis

2.1.4.1 Keratinisierung und Verhornung

Nach dem Verlassen der Basalzellschicht durchlaufen die Zellen vielfältige Differenzierungsprozesse, die die Keratinisierung und Verhornung einschließen. Damit verbunden sind Veränderungen in der Zellmorphologie und des Zellstoffwechsels. Dabei stehen die terminale Differenzierung und der programmierte Zelltod im Mittelpunkt. Am Ende resultiert aus beiden Prozessen das Stratum corneum, hier das Klauenhorn (ECKHART et al. 2013).

Unter der terminalen Differenzierung versteht man den mit drastischen morphologischen Veränderungen einhergehenden Übergang der Zellen vom Stratum granulosum durch die Übergangszone in das Stratum corneum (ISHIDA-YAMAMOTO und IIZUKA 1995). Zum einen ist sie gekennzeichnet durch die Synthese spezifischer Zytokeratine, der Keratinfilament-assoziierten Proteine (KFAP) und der membrane coating granules (MCG). Zum anderen kommt es infolge der Aktivierung proteolytischer Enzyme zur Ausbildung eines Zytoskeletts und des cornified cell envelopes (CE) (ECKHART et al. 2013, ISHIDA-YAMAMOTO und IIZUKA 1995). Des Weiteren werden die terminal differenzierten Zellen durch den Verlust des Nukleus, der Keratohyalin granula (KHG) und von weiteren Zellorganellen gekennzeichnet (HOUBEN et al. 2007).

Die epitheliale Verhornung ist ein Beispiel für den programmierten Zelltod, dem die basalen Keratinozyten ab dem Verlassen des Stratum basale bestimmt sind und ist von der Apoptose abzugrenzen (HOUBEN et al. 2007). Die Verhornung beginnt erst nach Abschluss der Zelldifferenzierung, wohingegen die Apoptose in jedem Zellstadium einsetzen kann (BRAGULLA und HOMBERGER 2009). Charakteristisch für die den programmierten Zelltod eingegangenen Korneozyten ist die Umgestaltung des Zytoskeletts, der Abbau des Zellkernes, das Ausbleiben der Phagozytose und die ausbleibende Aktivierung vieler apoptotisch wirksamer Caspasen (HOUBEN et al. 2007).

In der Epidermis sind der harte und der weiche Verhornungstyp zu unterscheiden. Die weiche Verhornung findet in Geweben mit Stratum granulosum in Gegenwart von basophilen Keratohyalin granula statt, wie beispielsweise in der Haut. Die Korneozy-

ten werden hier kontinuierlich an der Hornoberfläche abgeschilfert. Die harte Verhornung erfolgt in epidermalen Geweben ohne Stratum granulosum und ist charakteristisch für die Modifikationen der Zehenendorgane. Hier werden die Zellen des Stratum corneum nicht durch Abschilferung abgetragen, sondern durch Abnutzung an der Oberfläche (BRAGULLA und HOMBERGER 2009).

2.1.4.2 Membrane coating granules und membrane coating material

Seine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit erhält das Klauenhorn durch das während der Keratinisierung in den Zellen gebildete membrane coating material (MCM), auch als Interzellularkitt bekannt. Das MCM ist in den membrane coating granules (MCG), die auch als lamellar bodies bezeichnet werden, zu finden (BRAGULLA und HOMBERGER 2009, MÜLLING und BUDRAS 1998). Die MCGs werden im frühen Stadium der Zelldifferenzierung in den unteren Schichten des Stratum spinosum und dem Stratum granulosum gebildet (BRAGULLA und HOMBERGER 2009) und häufen sich in den differenzierten Zellen in der Umgebung des Golgi-Apparates an (MÜLLING 1993). Mit der Wanderung der Zellen in die oberen Zelllagen des Stratum spinosum und fortschreitender Zelldifferenzierung bewegen sich die MCGs in Richtung der Zellmembran und setzen ihren Inhalt per Exozytose in den Interzellularspalt frei, wo sie den Interzellularraum ausfüllen (BRAGULLA und HOMBERGER 2009, MÜLLING und BUDRAS 1998). Dieser Ablauf entspricht dem Verlauf der Keratinisierung bis hin zur Verhornung der Epidermis (MÜLLING und BUDRAS 1998).

Das MCM zeigt segmentspezifische Variationen seiner Komponenten in Abhängigkeit von den auf das Horn wirkenden mechanischen Kräften. In den Bereichen geringerer mechanischer Belastung, wie beispielsweise in den Saum- und Ballensegmenten, weist das MCM einen hohen Lipidanteil in Form von Membranstapeln auf und bewirkt die Ausbildung einer semipermeablen Barriere. Die mechanisch stark beanspruchten Segmente hingegen, in denen hartes Horn gebildet wird, sind gekennzeichnet durch einen hohen Anteil an Glykoproteinen, wodurch ein stabiler Zellverband ermöglicht wird. Hiermit wird deutlich, welche Bedeutung das MCM für die Stabilität des Horns, den Schutz gegen Noxen und die Regulation des Wassergehaltes hat (MÜLLING und BUDRAS 1998).

2.1.4.3 Keratine

Ein wichtiger Bestandteil der Zellen sind die Intermediärfilamente, die als Grundgerüst des Zytoskeletts vorwiegend der mechanischen Stabilität dienen. Die für epithe-

liale Gewebe charakteristischen Intermediärfilamente sind die Zytokeratinfilamente, die einen Durchmesser von 10 nm besitzen und aus den Zytokeratinen, kurz Keratine, aufgebaut werden (BRAGULLA und HOMBERGER 2009, ECKHART et al. 2013).

Bei den zytoplasmatisch lokalisierten Keratinen handelt es sich um wasserunlösliche Faserproteine, die mit ca. 80% den größten Anteil des Totalproteingehaltes differenzierter Zellen ausmachen und von denen bisher 19 im Säugetier identifiziert werden konnten (BRAGULLA und HOMBERGER 2009, STEINERT et al. 1984). Keratine lassen sich in zwei Gruppen einteilen: zum einen in die sauren Keratine oder Typ I-Keratine und zum anderen in die basischen Typ II-Keratine (BRAGULLA und HOMBERGER 2009). Die Typ I-Keratine schließen die Keratine 9 bis 20 (K9 bis K20) ein, deren Molekülmassen sich im Bereich von 41 bis 56,5 kDa bewegen und deren isoelektrischer Punkt (pI) unter 5,6 liegt. Zu den Typ II-Keratinen hingegen gehören die Keratine 1 bis 8 (K1 bis K8), deren Molekülmassen sich im Bereich von 55 bis 76 kDa bewegen und deren pI über 6,0 liegt (COOPER und SUN 1986, FUCHS und BYRNE 1994). So konnten COOPER und SUN (1986) den Keratinen humaner und boviner Epithelien bezogen auf Molekülgröße, elektrische Ladung und Immunnachweis ein ähnliches Expressionsverhalten nachweisen.

In der Epidermis werden Keratine ähnlicher Größenordnung koexprimiert, sodass jeweils ein saures Keratin zusammen mit einem basischen Keratin, welches um ca. 8 bis 10 kDa größer ist, ein Heterodimer ausbildet (BRAGULLA und HOMBERGER 2009, COOPER und SUN 1986, FUCHS und BYRNE 1994). Diese Heterodimere werden durch laterale und longitudinale Anordnung über Protofilamente und Protofibrillen zu Keratinfilamenten, die aus bis zu 32 Keratinen bestehen. Diese können wiederum zu größeren Tonofilamenten zusammengefügt werden (BRAGULLA und HOMBERGER 2009).

Die Keratinfilamente werden den Differenzierungsstadien der Zellen entsprechend gebildet und je nach Beanspruchung und Härtegrad angeordnet, sodass die verschiedenen Epithelien ein für sie charakteristisches Keratinmuster exprimieren (BRAGULLA und HOMBERGER 2009, LIEBICH 2004). So weisen hart keratinisierende Gewebe, wie beispielsweise die Klauenepidermis, eine sich von weich keratinisierenden Epithelien unterscheidende Keratinexpression mit hohen Anteilen an Histidin, Lysin und Arginin auf (BRAGULLA und HOMBERGER 2009). Des Weiteren kommt es während der terminalen Differenzierung zu einer veränderten Keratinzusammensetzung der epidermalen Zellen, sodass in den Basalzellen vorwiegend Keratine wie K5 und K14 exprimiert werden, in den suprabasalen und höher differenzierten Zellschichten hingegen größere, die sogenannten „harten“ Keratine wie K31,

K33, K34 und K81 (BRAGULLA und HOMBERGER 2009, FUCHS und GREEN 1980).

Parallel zu den Keratinfilamenten findet in den keratinisierenden Epidermiszellen die Synthese der Keratinfilament-assoziierten Proteine (KFAP) statt. Diese fördern die mechanische Stabilität, da sie über Disulfidbrücken eine Vernetzung mit den Keratinfilamenten ermöglichen (BRAGULLA und HOMBERGER 2009). In Kapitel 2.1.4.5 werden die KFAPs weiter erläutert.

2.1.4.4 Cornified cell envelope

Im Stratum corneum bewirkt das Enzym Transglutaminase eine Vernetzung der KFAPs. Dies hat die Bildung des cornified cell envelopes (CE) zur Folge, einem marginalen Band unter der Zellmembran (HOUBEN et al. 2007, MÜLLING et al. 1999), das dort zu finden ist, wo die Keratinfilamente in den Desmosomen der Zellen inserieren (MAREKOV und STEINERT 1998). Das CE ist eine 15 nm dicke und unlösliche Struktur, die aus zwei funktionellen Teilen besteht: zum einen aus einer Proteinhülle mit einer Dicke von 10 nm und zum anderen aus einer Lipidhülle mit einer Dicke von 5 nm (ECKERT et al. 2005, PROKSCH et al. 2008). Die KFAPs fungieren als Substrat für das CE und sind in das CE inkorporiert (ECKERT et al. 2005, ISHIDA-YAMAMOTO und IIZUKA 1995). Dabei werden zuerst die löslichen Proteine, wie z.B. Involukrin, und die small proline-rich proteins (SPR) eingebaut (ECKERT et al. 2005). Diese bilden eine Art Gerüst, an das im weiteren Verlauf der terminalen Differenzierung die unlöslichen Vorläuferproteine binden können, zu denen Lorikrin, Periplakin und Envoplakin zählen (ECKERT et al. 2005, MAREKOV und STEINERT 1998). Die Proteine des CE haben einen Anteil von etwa 7 bis 10% an der gesamten Epidermis (CANDI et al. 2005).

Funktionell gesehen unterstützt das CE die Epidermis in ihrer Funktion als wirksame Barriere gegen Umweltfaktoren (MAREKOV und STEINERT 1998) sowie als Schutz der Korneozyten vor proteolytischem Abbau (MÜLLING et al. 1999).

2.1.4.5 Die Keratohyalingranula und ihre Keratinfilament-assoziierten Proteine

Als Differenzierungsprodukt lassen sich in den Zellen des Stratum granulosum Keratohyalingranula (KHG) finden (HOUBEN et al. 2007). Die KHG enthalten die Keratinfilament-assoziierten Proteine – nichtfilamentöse Strukturproteine, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Zum einen die KFAPs, die CE bilden und zu denen Involukrin und Lorikrin gezählt werden. Zum anderen die strukturbildenden

KFAPs, die für eine Bündelung der Keratinfilamente sorgen und somit zur Ausbildung des Filament-Matrix-Komplexes zur Unterstützung des Zytoskeletts verhornender Zellen beitragen (BRAGULLA und HOMBERGER 2009).

Involukrin ist ein lösliches Vorläuferprotein des CE der Keratinozyten. Die Molekülmasse beträgt 68 kDa, wobei das Molekül von Glutamin und Glutaminsäure dominiert wird und eine zentrale α -Helix aufweist (ECKERT et al. 2005, ECKERT et al. 1993). Die Synthese ist ein Teil der terminalen Differenzierung und findet in den suprabasalen Zellschichten statt (BANKS-SCHLEGEL und GREEN 1981, ECKERT et al. 2005), in der Epidermis bereits während der frühen Differenzierung im Stratum spinosum. Die calciumabhängige Synthese von Involukrin (ECKERT et al. 1993) steht in direktem Zusammenhang mit der Zunahme der Zellgröße und der Wanderung der Zelle aus dem Stratum basale in die darüber liegenden Zellschichten (WATT und GREEN 1982). Nach der Synthese konzentriert sich Involukrin in der Zellperipherie (BANKS-SCHLEGEL und GREEN 1981) und wird anschließend auf der Zytoplasmaseite durch Transglutaminase an das CE gebunden, sodass es im CE der Zellmembran anliegt (CANDI et al. 2005). Es kann somit vorwiegend in den höheren Zelllagen der Epidermis nachgewiesen werden (ECKERT et al. 1993). Infolge der frühen Inkorporation in das CE bildet Involukrin ein Gerüst für weitere Vorläuferproteine wie beispielsweise Lorikrin, die durch Vernetzung an das CE gebunden werden (CANDI et al. 2005, ECKERT et al. 2005).

Die Hauptkomponente des CE ist **Lorikrin**, welches 70 bis 85% des Totalproteingehaltes des Stratum corneum ausmacht (CANDI et al. 2005). Dabei handelt es sich um ein unlösliches Protein, dessen Molekülmasse je nach Spezies variieren kann und 26 kDa in der humanen und 38 kDa in der murinen Epidermis beträgt (HOHL et al. 1991a, HOHL et al. 1991b, ISHIDA-YAMAMOTO et al. 1999). Dabei weist das Gen von Lorikrin eine dem von Involukrin ähnelnde Struktur auf (YONEDA et al. 1992). Die ebenfalls kalziumabhängige Lorikrinexpression findet erst im späteren Verlauf der terminalen Differenzierung im Anschluss an die Involukrinsynthese statt und wird dem Stratum granulosum zugeschrieben (ECKERT et al. 2005), in Geweben ohne Stratum granulosum hingegen den suprabasalen Zelllagen (BANKS-SCHLEGEL und GREEN 1981). Lorikrin wird nach der Synthese in den KHG gelagert: vorwiegend in den L-Granula und zusätzlich in den noch lebenden Epidermischichten gemeinsam mit Profilaggrin in den F-Granula (CANDI et al. 2005, YONEDA et al. 1992). Anschließend kommt es in den Körner- und Übergangszellen zur Auflösung der Granula mit der damit verbundenen Freisetzung von Lorikrin. In den ausdifferenzierten Zellen der Hornzellschicht erfolgt durch Transglutaminase eine Quervernetzung, sodass die Lorikrinepitope an der Innenseite der Zellen an das CE gebunden werden (CANDI et al. 2005, ECKERT et al. 2005, YONEDA et al.

1992). Lorikrin stellt ein Substrat für die Transglutaminasen TG1, TG2, TG3 und TG5 dar und erfährt dadurch verschiedene Quervernetzungen, wie beispielsweise mit den SPRs, Involukrin und Elafin (CANDI et al. 2005). Immunhistologisch lässt sich Lorikrin vermehrt im Stratum granulosum, in den unteren Zellschichten des Stratum corneum und geringfügig in den höheren Hornschichten nachweisen (HOHL et al. 1991a).

Ein weiteres Keratinfilament-assoziiertes Protein ist **Filaggrin**, das aus der Vorstufe Profilaggrin infolge verschiedener enzymatischer Umbauvorgänge entsteht. Profilaggrin ist ein 400 kDa großes unlösliches und phosphoryliertes Protein, das in den Körnerzellen der Epidermis exprimiert und in den F-Granula der KHG gelagert wird (ECKERT et al. 2005, ISHIDA-YAMAMOTO und IIZUKA 1995, PRESLAND et al. 1997). Seine Synthese ist kalziumabhängig und es besitzt als Kalziumbindestelle eine Helix-Schleife-Helix-Struktur (EF-Hand) (MARKOVA et al. 1993). Im Verlauf der terminalen Differenzierung kommt es zu einer Dephosphorylierung und Proteolyse des Profilaggrin, sodass daraus Filaggrinmoleküle resultieren (CANDI et al. 2005, PRESLAND et al. 1997). Diese besitzen im humanen Epithel eine Molekülmasse von 38 kDa und sind aus 317 Aminosäuren aufgebaut (CANDI et al. 2005, ISHIDA-YAMAMOTO und IIZUKA 1995). Funktionell dient Filaggrin der Bündelung und Organisation der Keratinfilamente in den unteren Schichten des Stratum corneum, die so Makrofibrillen ausbilden (CANDI et al. 2005, ECKERT et al. 2005, PRESLAND et al. 1997). In der verhornten Zelle findet schließlich der Abbau des Filaggrin in freie Aminosäuren statt, die wiederum für die Wasserspeicherung und Osmolarität eine wichtige Rolle spielen und dabei die Flexibilität des Stratum corneum gewährleisten (CANDI et al. 2005).

Das Enzym **Transglutaminase** (TG) umfasst eine Gruppe kalziumabhängiger Enzyme (ECKERT et al. 2005), welche durch die Katalyse stabiler kovalenter Bindungen die Stabilität und Unlöslichkeit des CE garantieren (CANDI et al. 2005). TG wird zur selben Zeit wie Involukrin in der frühen Phase der Zelldifferenzierung gebildet und liegt in zwei Formen vor – die eine an die Zellmembran gebunden und die zweite im Zytoplasma gelöst (ECKERT et al. 1993). Die proteolytische Quervernetzung der KFAPs wird durch die für die verhornende Epidermis spezifischen Transglutaminasen TG1, TG3 und TG5 katalysiert (CANDI et al. 2005, ECKHART et al. 2013).

2.1.5 Die Dermis (Lederhaut)

Als bindegewebige Schicht ist die Dermis der Epidermis unterlagert. Funktionell dient sie der Versorgung der Epidermis mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Verbin-

derung zwischen Hornkapsel und den darunterliegenden subkutanen und knöchernen Strukturen (HIRSCHBERG et al. 2001). Aufgebaut ist sie aus zwei Schichten: dem inneren Stratum reticulare, bestehend aus netzartig angeordneten Kollagenfasern, und dem äußeren Stratum papillare, das den bindegewebigen Papillarkörper ausbildet (MÜLLING und LISCHER 2002, SORRELL und CAPLAN 2004). Dieser bildet im Kron-, Sohlen- und Ballensegment fingerförmige Lederhautpapillen, Papillae dermales, und im Wandsegment die Lederhautblättchen, Laminae dermales, aus (GREENOUGH 2007b). Die dermalen Papillen und Blättchen, reich an Blutgefäßen und Nerven, dienen der Oberflächenvergrößerung, um per Diffusion eine adäquate Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der darüberliegenden avaskulären Epidermis zu gewährleisten (HIRSCHBERG et al. 1999). In Regionen hoher Hornbildungsrate, die in der Klaue durch die Lederhautpapillen repräsentiert werden, weist der Papillarkörper ein dichtes Kapillarnetz auf, wohingegen dieses im Bereich niedriger Hornbildungsrate, wie in den Hornblättchen des Wandsegmentes, weniger dicht ausgebildet ist. So können schon geringgradige Veränderungen der dermalen Mikrozirkulation zu pathologischen Veränderungen der proliferierenden Epidermiszellen führen (HIRSCHBERG et al. 2001).

2.2 Klauenrehe: Krankheitsbild und aktueller Wissensstand

Während das Vorkommen der equinen Hufrehe bereits seit 350 v. Chr. durch Aristoteles bekannt ist, wurde das Auftreten der Klauenrehe des Rindes erst 1843 durch Lafore und 1854 durch Anker beschrieben. Erste systematische Untersuchungen zum klinischen und morphologischen Bild der Klauenrehe wurden allerdings erst im Jahre 1963 von Nilsson vorgenommen (GREENOUGH 2007a). Bis vor 20 Jahren basierte der Wissensstand dieser Erkrankung auf den Erkenntnissen zur equinen Hufrehe. Aufgrund einiger Unterschiede, wie beispielsweise der Anatomie der distalen Gliedmaße, ist eine Übertragung der Ergebnisse auf die bovine Klaue mit Vorsicht vorzunehmen. Daher wurden in den letzten zwei Jahrzehnten intensive Untersuchungen zur bovinen Klauenrehe durchgeführt (MÜLLING und LISCHER 2002).

Definiert wird die Klauenrehe als eine aseptische diffuse Entzündung der Klauenlederhaut und wird demnach als Pododermatitis aseptica diffusa bezeichnet (DIRKSEN 2006, MÜLLING und LISCHER 2002). Im englischen Sprachgebrauch wird der Begriff ‚Laminitis‘ verwendet, der sich lediglich auf eine Entzündung der Wandlederhautblättchen bezieht. Die Erkrankung betrifft jedoch weitere Bereiche der Klaue, wie das Kron- und Sohlensegment (BERGSTEN 2003, BERRY 2001, DIRKSEN 2006, MÜLLING und LISCHER 2002, VERMUNT und GREENOUGH 1994). Daher sieht BERRY (2001) die Verwendung des Begriffes ‚Coriosis‘ als geeigneter an. Davon

abzugrenzen ist jedoch die subklinische Klauenrehe oder ‚claw horn disruption‘ (CHD) (VERMUNT 2007), die nicht durch das Auftreten primärer Entzündungsreaktionen geprägt wird (HOBLET und WEISS 2001, VERMUNT 2007). Der Begriff der CHD betont die Störung der Keratinisierung und somit der Hornproduktion, die sekundär zu Klauenläsionen führt (HOBLET und WEISS 2001, TØLBØLL et al. 2012). Die Klauenrehe wird als eine systemische Erkrankung angesehen, die sich durch degenerative Veränderungen der dermo-epidermalen Verbindung primär in den Klauen manifestiert und eine multifaktorielle Ätiologie besitzt (BERGSTEN 2003, MÜLLING und LISCHER 2002, VERMUNT und GREENOUGH 1994). Als Formen treten zum einen die entzündlich bedingte Klauenrehe mit ihren akuten, subakuten und chronischen Stadien und zum anderen die subklinische Klauenrehe auf. Diese werden im Folgenden erläutert.

2.2.1 Die entzündlich bedingte Klauenrehe

Die **akute Form** der entzündlich bedingten Klauenrehe tritt selten in der Milchviehhaltung, aufgrund der energiereichen Fütterung hingegen häufiger in der Mastrinderhaltung auf. Sie wird durch ein stark reduziertes Allgemeinbefinden gekennzeichnet und äußert sich symptomatisch mit einer erhöhten Atem- und Herzfrequenz und einer hochgradigen Lahmheit (GREENOUGH 2007a, MÜLLING und LISCHER 2002). Bei genauerer Untersuchung der Klaue können neben einer vermehrten Pulsation der Mittelfußarterie, einer erhöhten Temperatur des Klauensaumes und einer positiven Zangenprobe keine weiteren sichtbaren Klauenveränderungen diagnostiziert werden (MÜLLING und LISCHER 2002). Ausgelöst wird die akute Klauenrehe durch Aufnahme beträchtlicher Mengen an Getreide, was eine Pansenazidose zur Folge hat (BERGSTEN 2003, GREENOUGH 2007a).

In ihrer Symptomatik ähnelt die **subakute Klauenrehe** dem akuten Krankheitsverlauf. Hier sind die Symptome jedoch weniger stark ausgeprägt und die Tiere nur vorübergehend betroffen. Als Symptome treten eine steife Gangart, eine geringgradige Lahmheit und das sogenannte Trippeln, das Wechseln der belastenden Gliedmaße, auf (LISCHER und OSSENT 1994). Im Bereich des Sohlenhornes und der Weißen Linie ist die Klaue durch das Auftreten von Hämorrhagien und der Ausbildung eines gelblichen und weichen Hornes gekennzeichnet (LISCHER und OSSENT 1994, TOUSSAINT RAVEN 1998). Häufig entstehen charakteristische, parallel zum Kronsaum verlaufende Reherringe, die erst einige Zeit nach Auftreten der Klauenrehe zu finden sind (GREENOUGH 2007a). Aus den Klauenveränderungen kann somit geschlossen werden, dass die Klauenrehe seit geraumer Zeit bestehe. Da die Klaue allerdings noch nicht die für das chronische Stadium charakteristische Deformation

des Hornschuhes aufweist, muss es sich somit um eine Zwischenform der akuten und chronischen Rehe handeln (LISCHER und OSSENT 1994, TOUSSAINT RAVEN 1998). Eine erhöhte Prävalenz kann im postpartalen Zeitraum von ein bis zwei Monaten beobachtet werden (TOUSSAINT RAVEN 1998). Laut GREENOUGH (2007a) besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der subakuten Klauenrehe und einer plötzlichen und kurzzeitigen Fütterungsumstellung.

Das **chronische Stadium** wird gekennzeichnet durch ausgeprägte Veränderungen an der Klaue. Es entsteht ein abgeflachter und geweiteter Klauenschuh, dessen Dorsalwand eine konkave Form annimmt und aufgrund seiner charakteristischen Klauenform auch als 'slipper foot' bezeichnet wird. Die Veränderungen der Klauenform werden durch das Absinken und die Rotation des Klauenbeines in der Klauenkapsel bedingt. Infolge des erhöhten Drucks auf die Sohlenlederhaut kommt es einerseits zu einem gestörten Hornwachstum, wodurch weiches brüchiges Horn gebildet wird und typische Reherringe entstehen (MÜLLING und LISCHER 2002, OSSENT und LISCHER 1998, VERMUNT und GREENOUGH 1994). Eine weitere Folge kann andererseits die Ausbildung von Sohlenulzera sein (MÜLLING und LISCHER 2002, PETERSE 1985). Die chronische Form der Klauenrehe ist vorwiegend an den Außenklauen der Hintergliedmaßen zu finden (LISCHER und OSSENT 1994) und tritt vorwiegend in der Milchviehhaltung auf (MÜLLING und LISCHER 2002).

2.2.2 Die subklinische Klauenrehe oder claw horn disruption

Die größte Bedeutung kommt der am häufigsten vorkommenden und von den klinischen Stadien der Klauenrehe abzugrenzenden subklinischen Klauenrehe zu. Diese wird auch als claw horn disruption (CHD) bezeichnet, da infolge des Absinkens des Klauenbeins eine dermale Kompression und epidermale Schädigung resultieren. Diese führen zu einer gestörten Hornbildung auf zellulärer Ebene. Die CHD entsteht damit unabhängig vom Auftreten primärer Entzündungsreaktionen (HOBLET und WEISS 2001, VERMUNT 2007). Während es in der frühen Phase dieser Form zu pathophysiologischen Veränderungen kommt, können diagnostisch keine klinischen Anzeichen einer Erkrankung gefunden werden. Die pathologischen Veränderungen werden erst Wochen später bei der Klauenpflege sichtbar. Dazu gehören die Bildung eines weichen gelblichen Hornes und Hämorrhagien in der Sohle und der Weißen Linie (HOBLET und WEISS 2001, LISCHER und OSSENT 1994, MÜLLING und LISCHER 2002). Darüber hinaus schließt die subklinische Form reheassoziierte Läsionen ein, zu denen die White Line Disease, Zehen- und Sohlenulzera, 'dropped sole' (Deformationen der Sohlenoberfläche) und die Doppelsohlenbildung zählen. Diese entstehen zum einen aufgrund der herabgesetzten Widerstandsfähigkeit des

Klauenhornes, der Klauen- und Gliedmaßenstellung und des Einwirkens externer mechanischer Faktoren wie z.B. harter Untergründe, zum anderen infolge systemischer Imbalancen wie Pansenazidose, Ketose und Endotoxämien, ausgelöst durch eine inadäquate Fütterung (LISCHER und OSSENT 2002, MÜLLING und LISCHER 2002). Zu finden ist die subklinische Klauenrehe vorwiegend bei Hochleistungskühen in der Intensivhaltung während der frühen Laktationsphase sowie bei Weidemast-rindern und Mastbullen (GREENOUGH 2007a, HOBLET und WEISS 2001). Nach BERGSTEN (2003) sind als auslösende Faktoren die mit dem peripartalen Zeitraum verbundenen Umgebungs- und Fütterungswechsel und die Abkalbung an sich von großer Relevanz. Da die Rinder im peripartalen Zeitraum einen gesteigerten Energiebedarf aufweisen (VERMUNT 2005), entsteht häufig infolge eines Ungleichgewichtes zwischen Energieaufnahme und -bedarf eine negative Energiebilanz (SPURLOCK et al. 2012).

2.2.3 Pathophysiologie der claw horn disruption

Die Pathogenese der subklinischen Klauenrehe ist noch immer nicht vollständig geklärt und es ist eine Vielzahl an Theorien entwickelt worden, um die Veränderungen der dermalen Mikrozirkulation mit den daraus resultierenden pathologischen Veränderungen zu erklären (BERGSTEN 2003, HOBLET und WEISS 2001, MÜLLING und LISCHER 2002).

Traditionell wurde eine durch vasoaktive Substanzen, wie Histamin und Endotoxine, verursachte mikrovaskuläre Störung der Dermis als pathophysiologische Grundlage der subklinischen Klauenrehe angenommen (HOBLET und WEISS 2001). So beschrieb Nilsson 1963 erstmals die bovine Klauenrehe und ging von einer Histaminfreisetzung aus proteinhaltigen Fütterungsrationen als mögliche Erklärung für die Klauenrehe aus, was ebenfalls eine Theorie der equinen Hufrehe war (BERGSTEN 2003). Später konzentrierten sich die Untersuchungen auf eine metabolisch ausgelöste Klauenrehe, wie beispielsweise im Rahmen einer subakuten Pansenazidose (SARA) (BERGSTEN 2003, PLAIZIER et al. 2008), die indirekt zu einer veränderten Mikrozirkulation in der Dermis führt und damit zu einer Ischämie und einer gestörten Hornbildung in der Epidermis (HOBLET und WEISS 2001, VERMUNT und GREENOUGH 1994).

Basierend auf der Annahme, dass eine Störung der dermalen Mikrozirkulation mit nachfolgender Degeneration der dermo-epidermalen Verbindung vorliegt, entwickelten OSSENT und LISCHER (1998) schließlich die Drei-Phasen-Theorie der Klauenrehe. Demnach werde die erste Phase durch vaskuläre Störungen in der Lederhaut geprägt, die zur Degeneration der dermo-epidermalen Verbindung führen. Die ver-

änderte dermale Mikrozirkulation werde somit durch die Freisetzung systemischer Mediatoren bedingt und äußere sich in einer Paralyse der Gefäßwände, einer Vasodilatation und der Öffnung arterio-venöser Shunts. Als Folge entstünden zum einen Hämorrhagien und Ödeme, die den Druck innerhalb der Klauenkapsel erhöhen und zum anderen eine reduzierte Blutzirkulation in der Klaue, verbunden mit der Bildung von Thromben. Die sich daraus entwickelnde Ischämie, also die verminderte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, bewirke in den hornbildenden und proliferierenden Epidermiszellen die Produktion von minderwertigem Horn und den Verlust der strukturellen Integrität der dermo-epidermalen Verbindungszone. Erfolge die Trennung dieser Verbindung, beginne sich das Klauenbein innerhalb der Klauenkapsel abzusenken (OSSENT und LISCHER 1998).

Die zweite Phase werde schließlich durch das Absinken der distalen Phalanx und durch dermale Kompressionen im Sohlen- und Ballenbereich gekennzeichnet. Als Folge entstünden weitere Kapillarschäden, Hämorrhagien, Thrombosen, zelluläre Entzündungsreaktionen und ischämische Nekrosen. Bis zu diesem Zeitpunkt ließen sich diagnostisch noch immer keine klinischen Symptome finden (LISCHER und OSSENT 2002). Etwa acht Wochen nach Beginn trete die dritte Phase ein, in der sich die dermalen Läsionen klinisch in der Hornkapsel manifestieren und sichtbar werden. Als Resultat entstehe die chronisch deformierte Klaue, mitunter nach wiederholten Reheschüben (OSSENT und LISCHER 1998).

Diese Theorie leitete den Übergang von der traditionellen Auffassung der Klauenrehe zur aktuellen Forschung ein. So wird heute davon ausgegangen, dass die CHD nicht nur rein mechanisch infolge einer Überbelastung der Klaue oder allein durch metabolische Imbalancen ausgelöst wird, sondern infolge einer Kombination dieser Faktoren (HOBLET und WEISS 2001).

Zum einen führen metabolische Störungen wie die subakute Pansenazidose (SARA) oder eine inadäquate Fütterung zur Freisetzung von bioaktiven Mediatoren (BERGSTEN 2003, PLAIZIER et al. 2008). Es wird angenommen, dass durch Aufnahme großer Mengen an Endotoxinen und Milchsäure in das Blut direkt oder indirekt durch Freisetzung vasoaktiver Substanzen lokale Veränderungen der dermalen Mikrozirkulation entstehen. Diese können unter anderem Vasodilatationen sein, die zu einem reduzierten Blutfluss mit Blutstagnation und damit einem erhöhten intrakapsulären Druck führen, und die Öffnung von arteriovenösen Shunts und damit ein gestauter Blutfluss. Die daraus resultierende Ischämie, also die verminderte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, bewirkt durch Schädigung der proliferierenden und hornbildenden Zellen pathologische Prozesse in der Basalmembran der Epidermis (BERGSTEN 2003, HOBLET und WEISS 2001, VERMUNT und GREENOUGH 1994). Es kommt zur Bildung von minderwertigem Horn und zum Verlust der struktu-

rellen Integrität der dermo-epidermalen Verbindungszone (OSSENT und LISCHER 1998). Die Endotoxine bewirken außerdem die Bildung und Freisetzung von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, die die lokale Entzündungskaskade und Enzyme wie die Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2) aktivieren und die Verbindung zwischen der SARA und der Schädigung des Klauengewebes repräsentieren. Die MMPs werden durch Endotoxine, Cytokine und Hypoxie aktiviert (GREENOUGH 2007a) und weisen im peripartalen und laktierenden Zeitraum sowie bei Laufstallhaltungen eine erhöhte Aktivität auf (KNOTT et al. 2007). Die MMPs bewirken einen Abbau des Kollagens und eine Lockerung und Dehnung der Kollagenfasern des Aufhängeapparates (HENDRY et al. 2003, MÜLLING und LISCHER 2002). Dies führt gemeinsam mit dem Verlust der strukturellen Integrität der dermo-epidermalen Verbindung zum Absinken des Klauenbeines innerhalb der Klauenkapsel und somit durch Kompressionen der Dermis in Sohlen- und Ballenbereich zu mechanischen Verletzungen des mikrovaskulären Gefäßsystems. Durch die entstehenden Blutungen werden anschließend Blutpigmente in den Hornröhrchen und -blättchen eingeschlossen und als Hämorrhagien Wochen nach der Erkrankung an der Hornoberfläche sichtbar. Weitere Veränderungen der Klaue sind ein weiches gelbliches Horn, die Doppelsohlenbildung, Sohlenulzera, Veränderungen an der Weißen Linie und eine veränderte Klauenform (HOBLET und WEISS 2001, OSSENT und LISCHER 1998).

Zum anderen spielen mechanische Risikofaktoren, auch in Kombination mit metabolischen Veränderungen, bei der Auslösung der CHD eine bedeutende Rolle. So führt eine übermäßige Belastung der Klaue, verursacht durch harte Untergründe wie Beton, langes Stehen infolge fehlender Liegeflächen und das Zurücklegen weiter Strecken, zu einer dermalen Schädigung und der lokalen Freisetzung biogener Mediatoren (DIRKSEN 2006, HOBLET und WEISS 2001, LISCHER und OSSENT 1994). Infolge der veränderten Mikrozirkulation und der damit verbundenen lokalen Ischämie kommt es wiederum zu einer gestörten Zellproliferation der Epidermis, die einerseits in der Ausbildung eines minderwertigen Hornes und andererseits in einer gesteigerten Hornproduktion und in damit verbundenen Reheringen mündet (HOBLET und WEISS 2001, OSSENT und LISCHER 1998).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Hypothesen und Untersuchungen der CHD auf eine durch mikrovaskuläre Störungen in der Dermis bedingte Ischämie der epidermalen Keratinozyten hinweisen.

2.2.4 Risikofaktoren

Es ist eine Vielzahl an Risikofaktoren bekannt, die mit der Auslösung der CHD in Verbindung gebracht werden, sodass von einer multifaktoriellen Ätiologie ausgegan-

gen werden kann. So lassen sich die Risikofaktoren zum einen in die endogenen oder intrinsischen Faktoren, wie Körperkondition, Klauenform und Klauenqualität, und zum anderen in die exogenen oder extrinsischen Faktoren, wie Fütterung, Haltung und Tierverhalten, unterteilen. Dies ermöglicht die Abgrenzung einer individuell bedingten CHD von einer durch das Herdenmanagement bedingten Auslösung der CHD (HOBLET und WEISS 2001, TARLTON et al. 2002).

2.2.4.1 Endogene Faktoren

2.2.4.1.1 Peripartaler Zeitraum

Rinder im peripartalen Zeitraum weisen eine erhöhte Inzidenz für die subklinische Klauenrehe auf, die jedoch häufig unerkannt bleibt. Die reheassoziierten Klauenläsionen werden schließlich nach zwei bis drei Monaten sichtbar. Eine wesentliche Rolle spielen zum einen Stresssituationen, ausgelöst durch die Sozialisierung der Färsen in der Herde, den Wechsel von der Weidehaltung zur Laufstallhaltung auf Beton und die in Punkt 2.2.4.2.1 erläuterten Futterumstellungen. Zum anderen bewirken hormonelle Veränderungen der Tiere im peripartalen Zeitraum und Puerperalerkrankungen die Auslösung der Klauenrehe (HOBLET und WEISS 2001, LISCHER und OSSENT 1994).

2.2.4.1.2 Klauenform und Körperkondition

Körpergewicht, Körpergestalt und Gliedmaßenstellung sowie die Klauengröße und -gestalt stellen wichtige prädisponierende Faktoren dar. Übermäßig gerade Beine („post-legged“) mit einer verminderten Winkelung der Sprung- und Kniegelenke setzen die stoßdämpfende Wirkung der Muskulatur, Sehnen und Bänder herab und erhöhen die Anfälligkeit für Gelenkveränderungen und Klauenprobleme. In Kombination mit einem extremen Körpergewicht und kleinen Klauen führen die Druckkräfte innerhalb der distalen Gliedmaße vermehrt zu Kompressionen (VERMUNT und GREENOUGH 1994).

Eine höhere Inzidenz für Lahmheiten weisen Tiere mit einem niedrigen Body Condition Score (BCS) im Abkalbezeitraum und während der frühen Laktationsphase auf (HOEDEMAKER et al. 2009).

Ein wichtiger Faktor ist außerdem die Klauenpflege, um eine gleichmäßige und physiologische Belastung der Klaue zu gewährleisten und Lahmheiten zu verhindern. So konnten infolge einer mangelhaften oder inkorrekten Klauenpflege vermehrt Lahmheiten und Sohlenläsionen nachgewiesen werden (BERGSTEN 2003, VERMUNT

und GREENOUGH 1995). Eine weitere wichtige Funktion der Klauenpflege ist die Detektion von Läsionen im frühen Stadium, um weitere Klauenläsionen und damit verbundene klinische Symptome zu verhindern (BERGSTEN 2003).

2.2.4.1.3 Verhalten der Rinder

Das Verhalten der Rinder hat ebenfalls einen Einfluss auf die Inzidenz für Klauenläsionen. Ställe mit zu wenigen Liegeflächen und zu engen Durchgängen stellen für rangniedrigere Tiere einen großen Stressfaktor dar. Um aggressiven Konfrontationen mit dominanten Tieren zu entgehen, meiden sie die Liegeflächen oder weichen abrupt aus. Dies führt zu einer verstärkten Abnutzung und erhöhten mechanischen Belastung der Klauen sowie verlängerten Standzeiten (HOBLET und WEISS 2001, VERMUNT und GREENOUGH 1994).

2.2.4.1.4 Vasoaktive Substanzen

Im Rahmen von Stoffwechselentgleisungen wie der subakuten Pansenazidose und Ketosen (BERGSTEN 2003, GREENOUGH 2007a) und postpartalen Erkrankungen wie Mastitis, Metritis und Retentio secundinarum wird eine Freisetzung vasoaktiver Substanzen vermutet (HOBLET und WEISS 2001, LISCHER und OSSENT 1994, VERMUNT und GREENOUGH 1994). Vasoaktiven Mediatoren, zu denen unter anderem Histamin, Histidin und Serotonin zählen, wird einerseits eine vermehrte dermale Durchblutung zugeschrieben, andererseits aber auch eine Vasokonstriktion und Ischämie des dermalen Gefäßsystems der Klaue (GREENOUGH 2007a, HOBLET und WEISS 2001).

So wird angenommen, dass durch Aufnahme großer Mengen an Endotoxinen und Milchsäure ins Blut lokal allergische Reaktionen (GREENOUGH 2007a) oder aber auch direkt oder indirekt durch Freisetzung vasoaktiver Substanzen lokale Veränderungen der dermalen Mikrozirkulation und damit pathologische Prozesse in der Basalmembran der Epidermis entstehen (BERGSTEN 2003, VERMUNT und GREENOUGH 1994). Weiterhin bewirken sie eine Bildung und Freisetzung von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, die lokale Entzündungskaskaden und Enzyme wie die Matrixmetalloproteinase (MMP) aktivieren (GREENOUGH 2007a).

Histamin kann infolge von Immunreaktionen des Körpers oder durch Resorption im Gastrointestinaltrakt und im Uterus im Blut nachgewiesen werden. So konnten hohe Histaminkonzentrationen bei einem verringerten Pansen-pH-Wert und nach Aufnahme unzureichend fermentierter Silage nachgewiesen werden. Des Weiteren wird His-

tamin auf Grund von Infektionserkrankungen und mangelhaften Haltungsbedingungen gebildet und gelangt vom geschädigten Gewebe über die Blutbahn in das dermale Gefäßsystem (HOBLET und WEISS 2001, LISCHER und OSSENT 1994), wo es als Vasokonstriktor sowie als -dilator fungieren kann (HOBLET und WEISS 2001). Allerdings konnte bisher nicht wissenschaftlich nachgewiesen werden, ob Histamin in der Auslösung der Klauenrehe eine bedeutende Rolle spielt, da in Untersuchungen durch Histamininjektionen allein keine Rehesymptome ausgelöst werden konnten (BERGSTEN 2003).

2.2.4.1.5 Weitere endogene Faktoren

Einen weiteren Risikofaktor stellt das Alter der betroffenen Tiere dar. So tritt Klauenrehe bevorzugt bei erstgebärenden Färsen und jüngeren Rindern in Hochleistungsherden auf (HOBLET und WEISS 2001, VERMUNT und GREENOUGH 1994). Außerdem wird eine genetische Prädisposition für die Auslösung der Klauenrehe vermutet (LISCHER und OSSENT 1994).

2.2.4.2 Exogene Faktoren

2.2.4.2.1 Fütterung

Kohlenhydratreiche Fütterungsrationen können zu einer Säureanreicherung im Pansen und damit einem Abfall des pH-Wertes führen. Der pH-Abfall geht mit einer Änderung der Mikroflorazusammensetzung einher. Das Gleichgewicht verschiebt sich von den physiologisch vorhandenen gram-negativen Bakterien zugunsten gram-positiver milchsäurebildender Bakterien. Als Folge werden Endotoxine aus der Zellwand von zerstörten und sich auflösenden gram-negativen Bakterien freigesetzt (VERMUNT und GREENOUGH 1994).

Ein weiterer kritischer Faktor ist der abrupte Wechsel von einer faserreichen Fütterung in der Trockenstehzeit zu einer faserarmen Fütterung mit hohen Kraftfuttermitteln im postpartalen Zeitraum von zwei bis drei Monaten (BERGSTEN 2003, VERMUNT und GREENOUGH 1994). In zahlreichen Versuchen konnte infolge einer rohfaserreichen Fütterung eine verminderte Erkrankungshäufigkeit gezeigt werden. Der Partikelgröße kommt eine bedeutende Rolle zu, da langstieliges Rauhfutter ein gründliches Wiederkäuen und die Speichelproduktion fördert, was wiederum der Aufrechterhaltung eines physiologischen Pansen-pH-Wertes dient (VERMUNT und GREENOUGH 1994).

Als Ursache für Klauenrehe wird ferner der Proteingehalt der Futterrationen diskutiert. In einigen Studien konnte infolge einer proteinreichen Fütterung ein vermehrtes Auftreten von Klauenrehe und reheassozierten Klauenläsionen nachgewiesen werden (HOBLET und WEISS 2001). GREENOUGH et al. (1990) hingegen zeigten, dass energiereiche Futterrationen zu einer hohen Inzidenz an Sohlen- und Zehenulzera führten, hohe Proteingehalte dagegen keinen Einfluss auf Klauenrehe-assoziierte Läsionen hatten.

In Verbindung mit der Behandlung von Lahmheiten wird oftmals Biotin genannt. Als Kofaktor spielt Biotin bei der Bildung von langkettigen Fettsäuren und im Glukosemetabolismus eine wichtige Rolle. Weiterhin ist es in die Keratin-Synthese und in die Synthese der langkettigen Fettsäuren des MCM im Klauengewebe involviert. Die Ergebnisse von Fütterungsstudien mit Biotin zeigten einen positiven Effekt auf die Klauengesundheit: So konnten die Heilung von Sohlenulzera verbessert, die Integrität der Weißen Linie gefördert und das Auftreten von Klauenfissuren und Lahmheiten, insbesondere in der Weidehaltung, reduziert werden (BERGSTEN 2003, HOBLET und WEISS 2001).

2.2.4.2.2 Haltungsbedingungen und Kuhkomfort

Das Material und die Beschaffenheit des Stallbodens und der Liegeflächen, die Art der Haltung und die Stallhygiene spielen eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Klauenrehe. Hinzu kommen reduzierte Liegezeiten infolge einer zu großen Tierzahl und übermäßiges Stehen auf harten Untergründen (HOBLET und WEISS 2001, VERMUNT und GREENOUGH 1994).

Die Haltung von Rindern auf harten Böden wie Beton erhöht das Erkrankungsrisiko für subklinische Klauenrehe. So konnte in Untersuchungen festgestellt werden, dass bei Haltung auf Beton im Gegensatz zur Haltung auf Gummimatten die Tiere vermehrt Sohlenhämmorrhagien aufwiesen (BERGSTEN 2003).

Ein weiteres Kriterium stellen die Beschaffenheit und der Komfort der Liegeflächen dar. Geeignete und weiche Liegeflächen mit ausreichend Platz zum Aufstehen und Niederlegen erhöhen die Ruhezeiten. Diese können bis zu 15 Stunden am Tag betragen und werden von den Rindern zum Wiederkäuen genutzt. Ist dieser Rahmen nicht gegeben, kommt es durch ein vermehrtes Stehen einerseits zu einer Überlastung der Klauen und andererseits zu einer verlängerten Exposition der Klauen mit verunreinigten Bodenoberflächen. Dies führt zu einem erhöhten Auftreten von reheassozierten Lahmheiten (BERGSTEN 2003, VERMUNT und GREENOUGH 1994).

Bedingt durch zu harte Untergründe nimmt die konkave Form der äußeren Klaue der Hintergliedmaße ab, sodass eine flache oder konvexe Sohlenfläche entsteht und eine Gewichtsverlagerung von der Wand auf die Sohle stattfindet. Die stoßdämpfende Aufgabe müssen nun der Aufhängeapparat des Klauenbeins und das Ballenpolster übernehmen. Weiterhin entsteht infolge der Gewichtsverlagerung eine Klauenasymmetrie mit einer längeren Außenklaue und Sohlenläsionen als Folge. Bei Freilandrindern auf weichen Böden hingegen verläuft die Sohlenkonkavität von der äußeren Wand zum mittigen Teil, sodass nachweislich weniger Sohlenläsionen zu finden sind (BERGSTEN 2003).

Einen hohen Stellenwert nimmt außerdem die Bewegungsfreiheit der Tiere ein, da eine vermehrte Bewegung eine positive Auswirkung auf die Durchblutung der Lederhaut hat. Kommt es zu einer Reduktion der Bewegungsmöglichkeiten, führt dies zu einer verminderten dermalen Durchblutung und einer erhöhten Anfälligkeit für Verletzungen (NOCEK 1997, VERMUNT und GREENOUGH 1994).

2.2.4.2.3 Mechanische Faktoren

Eine übermäßige Belastung der Klauenlederhaut kann zu einer mechanisch bedingten Klauenrehe führen. Ursächlich dafür sind das Zurücklegen weiter Strecken und die Haltung der Tiere auf harten Untergründen. Zudem besteht eine Wechselwirkung zwischen metabolischen Entgleisungen und der Überbelastung der Klauen, die gemeinsam in der Ausbildung einer subklinischen Klauenrehe münden. Entsteht eine Überbelastung der Klauensohle durch innere und äußere Traumata, treten Veränderungen der dermalen Mikrozirkulation ein. Es folgen Schäden der Dermis und die lokale Freisetzung biogener Mediatoren, die letztendlich die Symptome der Klauenrehe hervorrufen (GREENOUGH 2007a, DIRKSEN 2006, LISCHER und OSSENT 1994).

Innerhalb der Klaue ist eine Schädigung des Aufhängeapparates möglich, die je nach Schwere, Belastung und biomechanischen Faktoren ein Absinken und eine mögliche Rotation des Klauenbeines verursacht. Diesem Ereignis folgt eine interne Kompression und Schädigung der Sohlendermis (BERGSTEN 2003, GREENOUGH 2007a).

2.3 Einsatz von In-vitro-Modellen epidermaler Keratinozyten

2.3.1 Keratinozyten in vitro als Forschungsgegenstand in der Zellkultur

Derzeit kommt besonders in der Humanmedizin validierten In-vitro-Hautmodellen, die die zellulären Mechanismen der Hautentwicklung und -gestaltung sehr genau darstellen können, eine immer größere Bedeutung zu (DEYRIEUX und WILSON 2007, LEMPER et al. 2014). So stellen Primärkulturen epidermaler Keratinozyten eine unbegrenzte Quelle für Zellen dar, die der Untersuchung molekularer Mechanismen der Epidermis dienen (LI 2013).

Durch den Einsatz von auf Keratinozyten basierenden In-vitro-Modellen kann in der heutigen Forschung unter anderem die Verwendung von Versuchstieren reduziert werden, womit diese unter ethischen Gesichtspunkten unverzichtbar sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass die an der Hautentwicklung beteiligten Zellen in vitro getrennt voneinander untersucht werden können. Da sie ein der Haut in vivo gleichendes Differenzierungsmuster aufweisen, stellen sie ein reproduzierbares Modell unter kontrollierten Bedingungen dar (LEMPER et al. 2014, POUMAY und COQUETTE 2007). Dabei gilt insbesondere das 3R-Prinzip – refinement, reduction, replacement – beachtenden Modellen die größte Aufmerksamkeit (LEMPER et al. 2014). In-vitro-Modelle basierend auf Keratinozyten finden vorwiegend in toxikologischen und pharmakologischen Untersuchungen Verwendung (LEMPER et al. 2014, POUMAY und COQUETTE 2007). Neben den ethischen Gesichtspunkten spielen hierbei der Zeitaufwand und der Ressourcenbedarf eine große Rolle (LEMPER et al. 2014).

Es können vier verschiedene Arten von Hautmodellen unterschieden werden, die aus gesunden Keratinozytendonoren stammen: 1. Monolayer, 2. epidermale Äquivalente, 3. Hautäquivalente und 4. entnommene Haut ex vivo (LEMPER et al. 2014).

Monolayer auf Basis von Keratinozyten sind hilfreich in der Untersuchung grundlegender Zellmechanismen wie beispielsweise der Signalübertragung. Ihre Etablierung hat zur Klärung der meisten funktionellen und strukturellen Charakteristika dieses Zelltyps beigetragen, die für das Grundlagenwissen über die Hautbiologie und -pathologie unerlässlich sind (LEMPER et al. 2014, POUMAY und COQUETTE 2007). Keratinozytenmonolayer können von Zellen aus Primärkulturen, aus immortalisierten Zelllinien oder von Stammzellen gebildet werden. Vor allem aufgrund ihrer einfachen Handhabung finden sie in der Zellkultur Verwendung (LEMPER et al. 2014). Ein Nachteil der Nutzung primärer Keratinozytenkulturen ist die Vielzahl an Donoren, ihr Bedarf an Supplementierung mit Wachstumsfaktoren und ihre begrenzte Lebensdauer in vitro. Zudem muss beachtet werden, dass Monolayerkulturen kein repräsentatives Modell für die Zelldifferenzierung und -keratinisierung darstellen. Zum einen ist die Lebensdauer der Zellen nach der Auslösung der Zelldifferenzie-

rung begrenzt, sodass keine Langzeituntersuchungen des Differenzierungsverhaltens durchgeführt werden können (DEYRIEUX und WILSON 2007, LEMPER et al. 2014). Zum anderen wird in vitro kein Stratum granulosum und corneum ausgebildet, wodurch sich Monolayer nicht für die Untersuchung der terminalen Differenzierung in diesem Bereich und somit der Untersuchung der Haut als Ganzes eignen (POUMAY und COQUETTE 2007).

Immortalisierte Zelllinien haben den Vorteil, dass sie einerseits nur von einem Donor abstammen und andererseits in den üblicherweise verwendeten Medien über längere Zeiträume kultiviert werden können. In vitro behalten sie ihre charakteristische Zellmorphologie und funktionellen Differenzierungseigenschaften bei, wodurch sie keratinisieren und stratifizieren können. Keratinozyten können weiterhin je nach Kalziumkonzentration zwischen differenzierten und basalen Zellstadien wechseln und exprimieren dementsprechende Differenzierungsmarker (DEYRIEUX und WILSON 2007, LEMPER et al. 2014).

Im Gegensatz dazu beinhalten epidermale Modelle eine voll ausdifferenzierte Epidermis. Die beteiligten Keratinozyten stammen dabei durchweg aus Primärkulturen. Allerdings war es bisher nicht möglich, aus Zelllinien geeignete Epidermisäquivalente in vitro zu entwickeln (LEMPER et al. 2014).

Aktuell werden bevorzugt organotypische Hautäquivalente verwendet. Diese bestehen aus einer von Keratinozyten gebildeten und ausdifferenzierten Epidermis und einer von Fibroblasten gebildeten Dermis. Die Gegenwart der dermalen Komponente beeinflusst zum einen die Ausbildung der Basalmembran und zum anderen die Keratinozytendifferenzierung, sodass eine der Haut entsprechende Architektur entsteht. Die Fibroblasten können sich dabei auf einem dreidimensionalen Scaffold befinden, was dem Modell Stabilität verleiht. Diese Epidermisrekonstruktion weist alle charakteristischen Zellschichten auf, die auch in vivo zu finden sind und zeichnet sich durch eine hohe Überlebensdauer aus. Nur solch ein Modell erlaubt die Untersuchung der Zelldifferenzierung und Keratinisierung der Keratinozyten. Weiterhin wird es in der Humanmedizin bevorzugt für Toxizitätstests sowie zur Behandlung von Hautverbrennungen und Wundheilungsstörungen verwendet (HINTERHUBER et al. 2002, LEMPER et al. 2014, POUMAY und COQUETTE 2007).

Ein Weiteres ist das Explant, ein Ex-vivo-Modell, das aus frisch entnommener Haut gebildet wird. Dieses Modell kennzeichnen viele Nachteile und Schwierigkeiten: Da die Haut nur unmittelbar nach der Entnahme verwendet werden kann, ist das Zeitfenster für eine Nutzung sehr klein und Hautkontraktionen lassen zudem kaum eine Penetration zu. Des Weiteren kann dieses Modell im Gegensatz zu den zuvor Beschriebenen nicht kryokonserviert und erst zum Zeitpunkt des Bedarfes genutzt werden. Ethisch fragwürdig erscheint zudem der hohe Bedarf an Hautmaterial. Dennoch

bildet es eine geeignete Alternative, um die Ergebnisse aus Untersuchungen mit Gewebezüchtungen (tissue engineering) zu validieren (LEMPER et al. 2014).

Aufgrund ihrer Fähigkeit der Selbsterneuerung nehmen Stammzellen in der Forschung einen immer größeren Stellenwert ein, da aus ihnen unbegrenzt Keratinozyten für die Zellkultur gewonnen werden können (LEMPER et al. 2014).

2.3.2 Einflüsse auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Keratinozyten

RHEINWALD und GREEN (1975a) konnten 1975 erstmals in vitro in einer Primärkultur die Keratinisierung einer teratogenen Zelllinie in Kombination mit 3T3-Zellen feststellen. Die Kultivierungsbedingungen übertrugen sie auf Zellkulturen mit epidermalen Keratinozyten und legten damit den Grundstein für die Kultivierung von Keratinozyten (POUMAY und COQUETTE 2007, RHEINWALD und GREEN 1975b). Epidermale Zellen wie Keratinozyten neigen mehr als andere Zellarten dazu, in vitro infolge desmosomaler Verbindungen untereinander gewebeähnliche Strukturen auszubilden. Im Gegensatz zur Epidermis in vivo wird jedoch in Monolayerkulturen in vitro kein Stratum granulosum und Stratum corneum ausgebildet (BANKS-SCHLEGEL und GREEN 1981).

Die Fähigkeit der Expression charakteristischer Keratine behalten die epidermalen Zellen in vitro bei (LI 2013). Jedoch passen sie diese an ihre Umgebung an, was zu einer veränderten Expression in vitro führen kann (EICHNER et al. 1984). Neben den Keratinen exprimieren sie in vitro weiterhin spezifische Marker der terminalen Differenzierung, zu denen Involukrin, Lorikrin und Filaggrin gehören (NGO et al. 2007).

Die Vermehrung von Keratinozyten in vitro wird aufgrund ihrer Tendenz zur terminalen Differenzierung erschwert, wobei sie ihre Teilungsfähigkeit irreversibel verlieren (RASMUSSEN et al. 2013). In vitro lassen sich drei verschiedene Klone von Keratinozyten unterscheiden: Holoklone, Paraklone und Meroklone. Die Holoklone besitzen eine hohe Proliferationsfähigkeit und können bis zu 160 Zellteilungen durchleben. Die Paraklone teilen sich zeitlich begrenzt und gehen anschließend die terminale Differenzierung ein. Dahingegen bilden die Meroklone ein Übergangsstadium zwischen den anderen beiden Gruppen. Eine vollständige Stratifizierung und histologische Differenzierung der epidermalen Keratinozyten in vitro kann durch die Verwendung von organotypischen Zellkulturmodellen erreicht werden, die ein Wachstum und eine Differenzierung der Keratinozyten unter in-vivo-ähnlichen Bedingungen ermöglichen (RASMUSSEN et al. 2013).

2.3.2.1 Der extrazelluläre Kalziumgehalt

Die Differenzierung basaler Keratinozyten kann in vitro durch eine Vielzahl von Faktoren induziert werden. Ein Beispiel dafür ist Kalzium, ein in der Epidermis physiologisch vorkommendes Agens, das die Zelldifferenzierung in vitro und in vivo auf ähnliche Weise auslöst und die Expression epidermaler Differenzierungsmarker entscheidend reguliert. In vivo werden die basalen Keratinozyten nur einer geringen Kalziumkonzentration ausgesetzt. Eine ansteigende Konzentration bewirkt das Verlassen des Zellzyklus und den Übergang zur terminalen Differenzierung. Dies erklärt die ansteigende Kalziumkonzentration in den höher differenzierten Zellschichten und damit den Kalziumgradienten in der Epidermis in vivo (DEYRIEUX und WILSON 2007, YUSPA et al. 1989). Durch Einstellung des extrazellulären Kalziumgehaltes können die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften variiert werden. Bei einem niedrigen Kalziumspiegel des Kulturmediums von 0,02 bis 0,05 mM wachsen die Keratinozyten in charakteristischer kopfsteinpflasterartiger (cobblestone-like) Morphologie und weisen eine hohe Proliferationsrate und die Expression der für Basalzellen typischen Keratine K5 und K14 auf (LI 2013). Eine Erhöhung des extrazellulären Kalziumspiegels hemmt die Zellproliferation und induziert die terminale Differenzierung in vitro, die mit der Stratifizierung der Keratinozyten einhergeht. Gleichzeitig findet die Expression spezifischer Marker der terminalen Differenzierung (LI 2013, POUMAY und COQUETTE 2007), wie Keratine der Spinosazellen K1 und K10 und Proteine der Granulosazellen Involukrin, Lorikrin und Filaggrin, statt. Da außerdem das Enzym Transglutaminase aktiviert wird, werden diese Proteine zur Ausbildung des CE quervernetzt (LI 2013). In Primärkulturen behalten Keratinozyten bei einer niedrigen Kalziumkonzentration ihre basale Gestalt. Werden über das Medium erhöhte Konzentrationen von 0,1 bis 0,16 mM gegeben, kommt es zur Auslösung der Zelldifferenzierung. Bei Inkubation der Keratinozyten in einem kalziumreichen Milieu bilden die Zellen eine kubische Gestalt aus und liegen dichter gepackt vor (DEYRIEUX und WILSON 2007, YUSPA et al. 1989). In vitro können Keratinozyten bei einer Konfluenz unter 85% im basalen oder differenzierten Stadium aufrechterhalten werden. So löst eine hohe Konfluenz in Kombination mit niedriger Kalziumkonzentration die Differenzierung der Keratinozyten aus, was die Expression von Keratin 1 und eine hohe Zell-zu-Zell-Dichte bewirkt. Bei hoher Konfluenz und hohem Kalziumgehalt wird die Bildung von Keratin 1 hingegen unterdrückt (DEYRIEUX und WILSON 2007).

Immortalisierte HaCaT-Zellen beispielsweise behalten in vitro ihre Morphogenese und Differenzierungseigenschaften bei und können über lange Zeiträume in Standardmedien kultiviert werden. Als Besonderheit können sie weiterhin je nach Kalziumkonzentration zwischen differenzierten und basalen Zellstadien wechseln und

dem Differenzierungsstadium entsprechend spezifische Marker exprimieren (DEYRIEUX und WILSON 2007).

Die Existenz eines die Epidermis in vivo übergreifenden Kalziumgradienten legt nahe, dass es sich bei Kalzium um einen entscheidenden Faktor des Differenzierungsstatus der Epidermis in vivo und in vitro handelt (LI 2013).

2.3.2.2 Zellgröße und Konfluenz

Allgemein wird in vitro schon unmittelbar in den suprabasalen Zellschichten die Synthese von Involukrin beobachtet und findet damit wesentlich früher als in der Epidermis in vivo statt (BANKS-SCHLEGEL und GREEN 1981, WATT und GREEN 1982).

WATT und GREEN (1981) untersuchten in einer Studie den Zusammenhang zwischen der Zellgröße humaner Keratinozyten in vitro und der Involukrinsynthese. Sie stellten fest, dass Involukrin in vielen Zellen ab einer Größe von über 18 µm und niemals in Zellen mit einer Größe unter 14 µm gebildet wird.

Die Zytokeratinmarker der terminalen Differenzierung Keratin 1 und 10 werden in vivo und in vitro noch vor der Synthese von Filaggrin und des CE exprimiert (YUSPA et al. 1989). Durch Erreichen der Konfluenz wird unabhängig von der Kalziumkonzentration ein Wachstumsstillstand mit starker Induktion der frühen Differenzierungsmarker Keratin 1 und Keratin 10 erreicht (POUMAY et al. 1999).

Wie in 2.3.2.1 erwähnt, können Keratinozytenkulturen bei einer Konfluenz von unter 85% in vitro aufrechterhalten werden. Keratin 1 wird vermehrt bei einer hohen Konfluenz in Kombination mit niedriger Kalziumkonzentration exprimiert. Dahingegen wird die Synthese von Keratin 1 durch eine hohe Konfluenz und einen hohen Kalziumgehalt unterdrückt (DEYRIEUX und WILSON 2007).

2.3.2.3 Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

NGO et al. (2007) wiesen in Keratinozyten eine sauerstoffabhängige Expression von Differenzierungsmarkern nach. So bewirken Sauerstoffkonzentrationen von 2% und 5% eine verminderte Expression der Differenzierungsmarker Involukrin, Lorikrin, Keratin 1 und Keratin 10. Die moderate Reduzierung der Sauerstoffkonzentration auf 5% zeigt einen geringfügigen bis fehlenden Effekt auf die Keratinozytenproliferation. Die weitere Reduzierung auf nur 2% zieht Zellkolonien nach sich, die eine verlangsamte Proliferation und abgeschwächte Stratifizierung aufweisen. Die verringerte Schichtbildung wird von einer reduzierten Involukrinexpression begleitet, da die oberflächlichen ausdifferenzierten Zellen fehlen. Der Wechsel zu einer niedrigeren Diffe-

renzierungsstufe und einer geringeren Stratifizierung resultiert in einem geringeren Anteil an reifenden Zellen, was sich in der verminderten Expression von Differenzierungsmarkern und einer gesteigerten Fähigkeit zur Koloniebildung zeigt. Die deutliche Suppression der Stratifizierung, die Vergrößerung und Differenzierung der Keratinozyten deuten eine tiefgreifende Rolle der Oxidierung im Programm dieser Zellen an. Ein ähnliches Zellverhalten kann bei Keratinozyten im kalziumarmen Medium beobachtet werden, welches ebenfalls die Schichtbildung und Differenzierung erschwert (NGO et al. 2007).

PENTLAND und MARCELO (1983) untersuchten im Rahmen der Wundheilungsforschung die Proliferation epidermaler Primärkulturen über einen Zeitraum von zwölf Tagen bei 5%, 7,5%, 10%, 12,5% und 15% Sauerstoff und stellten in ihren Untersuchungen eine irreversible Hemmung der Zellproliferation mit sinkenden Sauerstoffkonzentrationen fest (PENTLAND und MARCELO 1983).

Des Weiteren wirkt sich die chronische Exposition gegenüber erhöhten Sauerstoffkonzentrationen negativ auf das Zellwachstum aus. Die intermittierende Exposition von Keratinozyten in einem Hautäquivalent-Modell gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen hingegen stimuliert die Zelldifferenzierung und regt geringfügig das Zellwachstum an (NGO et al. 2007).

Im Gegensatz dazu konnte in humanen Keratinozyten unter anoxischen Bedingungen ein gutes Wachstum mit einer verbesserten Lebensdauer festgestellt werden (NGO et al. 2007).

STRASESKI et al. (2009) untersuchten die Wirkung von Sauerstoffentzug auf die Proliferation, Differenzierung und Expression von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen in einem organotypischen Hautmodell. Dieses wurde über bestimmte Zeiträume einer Hypoxie ausgesetzt und anschließend reoxygeniert. Die offensichtlichsten Veränderungen wurden nach 24 und 48 Stunden in den oberen suprabasalen Epidermischichten beobachtet und beinhalteten hydropische Zellschwellungen, den Verlust der intrazellulären Granula im Stratum granulosum und eine generelle Verschiebung der Zellkerne. Trotz der morphologischen Veränderungen blieben die Gewebe strukturell intakt. Bei einer 24-stündigen Inkubation der Gewebe unter Hypoxie zeigten diese 24 Stunden nach der Reoxygenierung die größten Veränderungen mit Zellvakuolen und Schwellungen. Innerhalb von 48 Stunden kam es jedoch zur Regeneration des Epithels und der Wiederherstellung der Zellmorphologie. Nach 72 bis 96 Stunden konnte kein Unterschied zu den unter normoxischen Bedingungen inkubierten Hautmodellen festgestellt werden. Im Vergleich zu den normoxischen Gewebemodellen konnte bei einer Hypoxie über 48 Stunden eine verminderte Keratinozytenproliferation gemessen werden (STRASESKI et al. 2009).

2.3.2.4 Abhängigkeit von der Glukoseversorgung

In Explants aus dem equinen Huf konnten FRENCH und POLLITT (2004) infolge eines Glukosemangels einen Verlust der dermo-epidermalen Verbindung und einen Zusammenbruch des Zytoskeletts der Basalzellen beobachten.

PORTUGAL-COHEN und KOHEN (2009) untersuchten im Rahmen von durch Diabetes mellitus verursachten pathologischen Hautveränderungen die Glukoseabhängigkeit epidermaler Keratinozyten, jedoch bezogen sich die Untersuchungen lediglich auf eine Hyperglykämie der Zellen. Um hyperglykämische Bedingungen in vitro darzustellen, setzten sie immortalisierte HaCaT-Zellen einem hohen Glukosespiegel von 50 mM (9 mg/ ml) Glukose aus. Infolge der Hyperglykämie konnte nach neun Stunden eine Abnahme der Zellviabilität um 50% detektiert werden (PORTUGAL-COHEN und KOHEN 2009).

2.3.2.5 Autokrine Beeinflussung

POUMAY et al. (1999) untersuchten die Abhängigkeit der Expression früher und später Differenzierungsmarker von der Zelldichte in von Tretinoin und Tetradeacanoylphorbol-acetat autokrin beeinflussten Keratinozytenkulturen. Sie zeigten, dass diese sensitiv auf autokrine Regulatoren der epidermalen Differenzierung reagieren. Die Synthese der Zytokeratine 1 und 10 wird bei autokriner Supplementierung und Erreichen der Konfluenz induziert, allerdings in postkonfluenten Keratinozytenkulturen aufgrund der Akkumulation dieser beiden Zytokeratinproteine herunterreguliert. Involukrin zeigt unter autokrinen Bedingungen in subkonfluenten Kulturen lediglich eine geringgradige Expression, welche jedoch bei Erreichen der Konfluenz stark ansteigt und mit der Stratifizierung und Differenzierung einhergeht. In postkonfluenten Kulturen ist die Involukrinexpression schließlich um ein Vielfaches größer. Die Expression des basalen Keratin 14 wiederum wird nachweislich nicht durch die Zelldichte in autokrinen Kulturen beeinflusst (POUMAY und COQUETTE 2007, POUMAY et al. 1999).

In Epidermisäquivalenten zeigt die Supplementierung mit EGF, dem epidermal growth factor, oder KGF, dem keratinocyte growth factor, einen stimulativen Effekt auf die Keratinozytenproliferation und -migration. In Gegenwart von Fibroblasten hat KGF lediglich eine minimale Wirkung auf die Keratinozyten und die Involukrinsynthese findet in den oberen Zellschichten statt. Infolge einer EGF-Supplementierung kann eine Zunahme der Epidermisdicke beobachtet und die Involukrinexpression schon in den unteren suprabasalen Zellschichten nachgewiesen werden (EL GHALBZOURI et al. 2002).

Weiterhin wird durch die autokrine Supplementierung die Mitoserate der Keratinozyten beeinflusst. So kann in subkonfluenten Keratinozytenkulturen eine Vielzahl an mitotischen Figuren gefunden werden, die bei Erreichen der Konfluenz jedoch abwesend sind. In postkonfluenten Kulturen setzt infolgedessen die zelluläre Stratifizierung ein (POUMAY et al. 1999).

2.3.2.6 Weitere Einflüsse

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Proliferation der Keratinozyten und ihre Fähigkeit der Subkultivierung ist die komplexe Beziehung zwischen ihnen und den Fibroblasten (DOWNING et al. 2005, RHEINWALD und GREEN 1975b). EL GHALBZOURI et al. (2002) untersuchten die Wirkung von Fibroblasten auf ein In-vitro-Epidermisäquivalent. In Abwesenheit der Fibroblasten weist die Epidermis lediglich zwei bis drei lebensfähige Zellschichten und ein dünnes Stratum corneum auf. Ein deutliches Stratum granulosum hingegen fehlt. In Gegenwart der Fibroblasten kommt es wiederum zur Stimulation der Proliferation und Migrationsfähigkeit der Keratinozyten. Mit steigender Anzahl an Fibroblasten wird die Gewebearchitektur durch Zunahme der lebensfähigen Zellschichten und ein präsenes Stratum granulosum ausgeprägter. Die Stimulation durch Fibroblasten zeigt dabei einen biphasischen Charakter. In der Initialphase nimmt die Keratinozytenproliferation zu und fällt in den späteren Kultivierungsstadien schließlich ab. Durch den Einfluss der Fibroblasten findet die Involukrin- und Transglutaminase-1-Expression in allen suprabasalen Epidermislagen statt, wobei sich die Expression beider Differenzierungsmarker mit zunehmender Fibroblastenzahl in die oberen Zellschichten verlagert. Außerdem kann infolge einer steigenden Fibroblastenzahl eine verminderte Synthese der Keratine 16 und 17 beobachtet werden. Auf die Keratin-10-Expression hat die Präsenz der Fibroblasten hingegen keinen Effekt (EL GHALBZOURI et al. 2002).

2.3.3 Oxygen glucose deprivation (OGD)

Wie in Kapitel 2.2.3 erläutert, weisen die bisherigen Untersuchungen und Hypothesen der CHD auf eine veränderte dermale Mikrozirkulation und eine damit einhergehende Ischämie in der Klauenepidermis hin (MÜLLING und LISCHER 2002). So wird angenommen, dass eine lokale Ischämie in der Epidermis und die darauffolgende Reoxygenierung zu einem Verlust der Gewebeintegrität führt (STRASESKI et al. 2009). Ein besonderes Interesse gilt daher den In-vitro-Untersuchungen ischämisch

bedingter Pathomechanismen auf zellulärer Ebene, die zu einer Störung der epidermalen Proliferation und Differenzierung führen (MÜLLING und LISCHER 2002).

Für diese Untersuchungen eignen sich In-vitro-Ischämiemodelle, die einen gleichzeitigen Sauerstoff- und Glukoseentzug untersuchen und vorrangig in der Schlaganfallforschung eingesetzt werden. Solche Modelle werden als Oxygen-glucose-deprivation-Modell (OGD) bezeichnet und basieren bevorzugt auf neuronalen Zellen oder Astrozyten (MELONI et al. 2011). Dahingegen sind auf Keratinozyten basierende und die OGD verwendende Ischämiemodelle noch nicht etabliert worden. Im Fokus standen bisher lediglich In-vitro-Modelle, die entweder die Auswirkungen einer Hypoxie (MEDINA-TORRES et al. 2011, NGO et al. 2007, STRASESKI et al. 2009) oder die eines Glukosemangels auf epidermale Keratinozyten untersuchen (FRENCH und POLLITT 2004). So wurde im Rahmen der Hufreheforschung in einem In-vitro-Modell equiner Keratinozyten die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen infolge einer Hypoxie sowie in der Erforschung bestimmter Hauterkrankungen das sauerstoffabhängige Differenzierungsverhalten humaner Keratinozyten untersucht (NGO et al. 2007, PENTLAND und MARCELO 1983, STRASESKI et al. 2009). Weiterhin verwendeten FRENCH und POLLITT (2004) in Verbindung mit der akuten Hufrehe als ischämische Bedingung in vitro den Glukosemangel, um in Explants aus dem Pferdehuf die damit zusammenhängende Trennung der dermo-epidermalen Verbindung zu untersuchen.

Da eine vaskulärbedingte Ischämie einen Sauerstoff- und Glukosemangel umfasst, stellen OGD-Modelle eine den In-vivo-Bedingungen entsprechende und damit geeignetere Möglichkeit zur Untersuchung ischämisch bedingter Pathomechanismen dar. Ziel dieser Ischämiemodelle ist dabei die Darstellung des reduzierten intrazellulären Energiezustands bei erfolgter Ischämie, der meist mit dem Zelltod endet. Die Reaktion der sterbenden Zellen auf die Ischämie ist dabei abhängig von der Schwere des Geschehens, tritt über einen langen Zeitverlauf ein und kann Eigenschaften wiedergeben, die charakteristisch für Nekrose, Apoptose, Autophagie oder Nekroptose sind (MELONI et al. 2011).

Das zugrundeliegende Prinzip einer OGD sieht die Inkubation der verwendeten Zellart mit glukosefreiem Nährmedium unter hypoxischen Bedingungen über definierte Zeiträume vor. Im Anschluss an eine durchgeführte OGD findet die Reperfusion der Zellen statt. Diese umfasst den unmittelbaren Austausch des Mediums mit glukosehaltigem Nährmedium und schließlich die Inkubation über einen bestimmten Zeitraum unter normoxischen Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit) (MELONI et al. 2011). Bei Untersuchungen zur Sauerstoff- und Glukoseabhängigkeit werden die Zellen demnach entweder unter hypoxischen Bedingungen oder mit glukosefreiem Medium inkubiert. Im Anschluss findet ebenfalls entweder

eine Reoxygenierung oder eine Reperfusion mit glukosehaltigem Medium statt (PORTUGAL-COHEN und KOHEN 2009, STRASESKI et al. 2009). Da im Rahmen der CHD eine ischämisch bedingte Veränderung der Zellproliferation und -differenzierung vermutet wird (MÜLLING und LISCHER 2002), wird im Anschluss an eine erfolgte OGD die Zellviabilität bestimmt. Dafür eignen sich der LDH(Lactatdehydrogenase)-Zytotoxizitätsassay sowie der MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrafazoliumbromid)-Reduktionsassay (MELONI et al. 2011). Weiterhin findet die Untersuchung einer veränderten Zelldifferenzierung anhand der Expression von Differenzierungsmarkern statt. Im Fokus stehen dabei die Marker der terminalen Differenzierung Involukrin und Lorikrin, die nachweislich ein sauerstoffabhängiges Expressionsverhalten aufweisen (NGO et al. 2007).

2.3.4 Relevanz eines In-vitro-Ischämiemodells in der heutigen Klauenreheforschung

Da im Mittelpunkt der Erforschung pathophysiologischer Mechanismen der Klauenrehe die Ischämie infolge einer veränderten dermalen Mikrozirkulation steht (GREENOUGH 2007a, HOBLET und WEISS 2001, VERMUNT und GREENOUGH 1994), gilt ein besonderes Interesse dem Verständnis initialer Ereignisse im frühen Stadium der Pathogenese. Von Bedeutung sind dabei In-vitro-Modelle, mit deren Hilfe die epidermale Zellantwort auf die pathologischen dermalen Mechanismen und die damit verbundene dermo-epidermale Zusammenhangstrennung untersucht werden können (MÜLLING und LISCHER 2002).

Die bisher etablierten In-vitro-Modelle zur Rinderklaue umfassen Monolayerkulturen und organotypische Modelle bestehend aus bovinen Keratinozyten und Fibroblasten (NEBEL 2005). Hinzu kommen Kokulturmodelle basierend auf Keratinozyten und Endothelzellen zur Untersuchung der Zellproliferation und -differenzierung (SARCEV 2012) sowie 3D In-vitro-Angiogenesemodelle basierend auf bovinen Endothelzellen zur Untersuchung der Rolle angiogener und intussuszeptiver Prozesse in der Entwicklung der dermalen Mikrovaskularisation (HIRSCHBERG und PLENDL 2005). Zum Einsatz kamen diese Modelle lediglich in der Grundlagenforschung zur funktionellen Morphologie der Rinderklaue, jedoch verweisen sie alle auf eine weitergehende Verwendung in der Erforschung der mit Klauenrehe zusammenhängenden pathophysiologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene (HIRSCHBERG und PLENDL 2005, NEBEL 2005). Dahingegen werden in der Hufreheforschung bereits weiterführende In-vitro-Modelle equiner Keratinozyten aus dem Huf zur Untersuchung der zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen angewendet. Anhand dieser In-vitro-Modelle wurde vorwiegend der Zusammenhang zwischen ei-

ner vaskulär bedingten Ischämie und der MMP-Aktivierung analysiert, die letztendlich eine Zusammenhangstrennung der dermo-epidermalen Verbindung zur Folge hat (FRENCH und POLLITT 2004, MEDINA-TORRES et al. 2011). Als ischämische Bedingungen wurden dabei entweder eine Hypoxie (MEDINA-TORRES et al. 2011) oder ein Glukoseentzug angewendet (FRENCH und POLLITT 2004).

Die somit erstmalige Anwendung dieses In-vitro-Ischämiemodells basierend auf einem gleichzeitigen sowie einem separaten Sauerstoff- und Glukoseentzug erschien für die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen aufgrund vieler Aspekte als sinnvoll. Zum einen bietet dieses Modell eine geeignete Möglichkeit zur Untersuchung molekularbiologischer Mechanismen der Epidermis unter physiologischen Bedingungen (STRASESKI et al. 2009). Zum anderen dient es der Untersuchung pathophysiologischer Grundlagen der Klauenrehe, die infolge einer gestörten dermalen Mikrozirkulation und der daraus resultierenden epidermalen Ischämie entstehen (MÜLLING und LISCHER 2002).

3 Materialien

3.1 Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Keratinozyten wurden aus der Klauenepidermis des Saum- und proximalen Wandsegmentes von insgesamt 13 geschlachteten Rindern isoliert. Die Kultivierung der isolierten Keratinozyten fand mit speziellem Keratinozytenmedium statt, bis nach vier bis fünf Zellpassagen eine Reinkultur erreicht wurde. Vor dem Einsatz in den Versuchen wurden die Keratinozyten morphologisch und immunzytochemisch charakterisiert.

3.2 Medien, Medienzusätze und Lösungen

3.2.1 Medien

Tab. 3.1 Keratinozytenmedium für die Zellisolierung

Ingredienz	Konzentration
Penicillin/Streptomycin	0,5 mL
Amphotericin B	0,1 mL
Fetales Kälberserum	2,5 mL
EGF	2 ng/mL
Keratinocyte-SFM	ad 50 mL

Tab. 3.2 Keratinozytenmedium für höhere Zellpassagen

Ingredienz	Konzentration
Penicillin/Streptomycin	0,5 mL
Fetales Kälberserum	5,0 mL
EGF	2 ng/mL
DMEM, Low Glucose, GlutaMAX™, Pyruvate (DMEM)	ad 50,0 mL

Tab. 3.3 Medium für die OGD

Ingredienz	Konzentration
Penicillin/Streptomycin	0,5 mL
DMEM glucosefrei	ad 50,0 mL

3.2.2 Lösungen und Puffer

Tab. 3.4 Paraformaldehydlösung (4%)

Ingredienz	Konzentration
Paraformaldehyd	0,4 g
ddH ₂ O	0,1 mL
PBS	ad 10 mL
pH 7,4 (mit NaOH einstellen)	

Tab. 3.5 Kaliumphosphatpuffer (50 mM)

Ingredienz	Konzentration
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	5,7 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	3,4 g
ddH ₂ O	ad 500 mL
pH 7,5	

Tab. 3.6 NADH

Ingredienz	Konzentration
NADH Di-Natriumsalz	100 mg
Kaliumphosphatpuffer	10,0 mL

Tab. 3.7 Pyruvat

Ingredienz	Konzentration
Brenztraubensäure Natriumsalz	100 mg
Kaliumphosphatpuffer	10 mL

Tab. 3.8 MTT-Lösung

Ingredienz	Konzentration
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT) (5 mg/mL ddH ₂ O)	Ein Sechstel
Kulturmedium	Fünf Sechstel

Tab. 3.9 MTT-Lysepuffer

Ingredienz	Konzentration
DMSO	99,4 mL
Essigsäure	0,6 mL
SDS	10,0 g

Tab. 3.10 mRIPA

Ingredienz	Konzentration
NP-40 (TritonX-100 oder Tween20)	1%
Na-desoxycholat	1%
SDS	0,1%
HEPES (pH 7,4)	50 mM
NaCl	150 mM
Glycerol	10%
MgCl ₂	1,5 mM

Tab. 3.11 mRIPA-Lysispuffer (2,0 mL)

Ingredienz	Konzentration
mRIPA	2 mL
Proteinase-Inhibitor	10 µl
Tyrosin Phosphatase Inhibitor	100 µl
Serin/Threonin Phosphatase Inhibitor	100 µl

Tab. 3.12 10x Running Buffer (1000 mL)

Ingredienz	Konzentration
Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS-Lösung (20%)	50 mL
ddH ₂ O	ad 1000 mL
pH 8,3/8,6	

Tab. 3.13 4x Lower Buffer (500 mL) = 1M Tris-HCl pH 8,8

Ingredienz	Konzentration
Tris	91 g
SDS-Stocklösung (20%)	10 mL
ddH ₂ O	ad 500 mL
pH 8,8 (mit 35% HCl einstellen)	

Tab. 3.14 4x Upper Buffer (250 mL) = 1M Tris-HCl pH 6,7

Ingredienz	Konzentration
Tris	15,25 g
SDS-Stocklösung (20%)	5 mL
ddH ₂ O	ad 250 mL
pH 6,7 (mit 35% HCl einstellen)	

Tab. 3.15 Ladepuffer (6x)

Ingredienz	Konzentration
Upper Buffer	7 mL
Glycerol	3 mL
SDS-Stammlösung (20%)	5 mL
Bromphenolblau	1 mg
β-Mercaptan	350 µL

Tab. 3.16 10%iges Trenngel

Ingredienz	Konzentration
ddH ₂ O	7,9 mL
30% Rotiphorese	6,7 mL
Tris-HCl (pH 8,8)	7,5 mL
10% SDS-Lösung	200 µL
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	200 µL
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	20 µL

Tab. 3.17 5%iges Sammelgel

Ingredienz	Konzentration
ddH ₂ O	3,4 mL
30% Rotiphorese	0,83 mL
Tris-HCl (pH 6,8)	0,63 mL
10% SDS-Lösung	50 µL
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	50 µL
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5 µL

Tab. 3.18 10x TBS

Ingredienz	Konzentration
Tris	24,2 g
NaCl	80 g
ddH ₂ O	ad 1000 mL
pH 7,6 (mit 35% HCl einstellen)	

Tab. 3.19 1x TBS-T

Ingredienz	Konzentration
10x TBS	100 mL
ddH ₂ O	900 mL
Tween 20	1 mL (0,1%)

Tab. 3.20 Blocking Buffer

Ingredienz	Konzentration
1x TBS-T (tween 0,1%)	50 mL
Milchpulver (3%)	1,5 g

Tab. 3.21 0,1M Tris-HCl pH 8,5

Ingredienz	Konzentration
Tris	6,05 g
ddH ₂ O	ad 500 mL
pH 8,5 (mit 35% HCl einstellen)	

Tab. 3.22 Luminol-Stocklösung (250mM)

Ingredienz	Konzentration
Luminol	0,4429 g
DMSO	10 mL

Tab. 3.23 Cumarsäure-Stocklösung (90mM)

Ingredienz	Konzentration
Cumarsäure	0,07389 g
DMSO	5 mL

Tab. 3.24 Luminol-Cumarsäure-Reaktionslösung

Ingredienz	Konzentration
0,1M Tris-HCl pH 8,5	20 mL
H ₂ O ₂	2,7 µL
Luminol-Stocklösung	50 µL
Cumarsäure-Stocklösung	25 µL

Tab. 3.25 Stripping Buffer

Ingredienz	Konzentration
NaCl (0,5M)	2,92 g
Glycin (0,2M)	1,5 g
pH 2,8 mit 35% HCl einstellen	

3.2.3 Verwendete Antikörper

Tab. 3.26 Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Klon/Spezies	Hersteller	Bestell-Nr.
Maus anti-Panzytokeratin (PZK)	C-11	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	C2931
Maus anti-Keratin, HMW Ab-3 (KER)	34βE12	dianova GmbH, Hamburg	DLN-07797
Polyclonal anti-Involukrin (IVL)	Involukrin	Aviva Systems Biology Corp., San Diego, USA	ARP48675
Polyclonal anti-Lorikrin (LOR)	Lorikrin	Aviva Systems Biology Corp., San Diego, USA	ARP41738
Maus anti-β-Aktin (βAKT)	AC-15	Novus Biologicals, Littleton, USA	NB600-501

Tab. 3.27 Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Klon/Spezies	Hersteller	Bestell-Nr.
Ziege anti-Maus IgG (H+L)-Cy3	polyklonal	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK	115-165-003
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-Alexa Fluor 488	polyklonal	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK	111-545-003
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO	polyklonal	dianova GmbH, Hamburg	111-035-003
Schaf anti-Maus IgG (H+L)-HRPO	polyklonal	dianova GmbH, Hamburg	515-035-003

4 Methoden

4.1 Isolation

Als Isolationsmaterial dienten die Klauen von insgesamt 13 Schlachtrindern, die unmittelbar während des Schlachtvorgangs entnommen wurden. Anschließend wurden sie gekühlt in das Veterinär-Anatomische Institut transportiert, sodass die Isolation innerhalb von zwei Stunden post mortem begonnen werden konnte.

Für die Isolierung der Keratinozyten wurde das Isolationsprotokoll von NEBEL (2005) modifiziert und ein geeignetes Protokoll für die Isolierung boviner Keratinozyten aus der Klaue etabliert. Die Keratinozyten wurden unter standardisierten Bedingungen gewonnen, wobei der erste makroskopische Isolationsprozess in der Sektionshalle und der zweite mit der enzymatischen Verdauung beginnende Isolationsabschnitt im Zellkulturlabor durchgeführt wurde.

Nach einer gründlichen Reinigung der Klauen wurden mithilfe der Tischbandsäge 1 cm breite Sagittalscheiben gewonnen, deren äußere Hornschicht sowie die sehnigen und knöchernen Strukturen entfernt wurden. Mithilfe eines Skalpells wurden die nun aus Epidermis und Dermis bestehenden Klauenstücke in ca. 0,5 x 0,5 cm große Probenstücke geschnitten, in PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C in einer 0,1%igen Trypsinlösung inkubiert.

Für die weitere Aufbereitung der Proben wurden diese für 30 Minuten bei 37°C im Hybridisierungssofen unter ständigem Schwenken inkubiert. Die Verdauungsreaktion wurde durch Zugabe eines serumhaltigen Waschmediums gestoppt und eine weitere Zerkleinerung der Gewebestücke mittels Trituration erreicht. Um die größeren, unverdauten Gewebestücke zu entfernen, wurde die Zellsuspension durch ein 40 µm-Zellsieb gegeben. Daraufhin wurde die erhaltene Zellsuspension bei 1100 U/Min fünf Minuten lang zentrifugiert und der Überstand entfernt. Für die anschließende Resuspendierung des Zellpellets wurde ein spezielles Keratinozytenmedium verwendet, um das Fibroblastenwachstum zu hemmen. Die Zellen wurden schließlich in der gewünschten Zelldichte ausplattiert und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im CO₂-Inkubator kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Keratinozyten lichtmikroskopisch auf Adhärenz und Vitalität untersucht, sodass nach 48 Stunden der erste Medienwechsel durchgeführt werden konnte.

4.2 Kultivierung der Keratinozyten

Die Kultivierung der Keratinozyten erfolgte im CO₂-Inkubator unter standardisierten Bedingungen (37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit). In den ersten drei Wochen nach der Isolation wurden die Keratinozyten zur Unterdrückung des Fibroblastenwachstums mit einem speziellen Keratinozytenmedium versorgt. Anschließend fand ein Wechsel zu einem auf DMEM basierenden Medium statt das mit 10% FKS, Penicillin/Streptomycin und EGF supplementiert wurde.

Innerhalb der ersten Woche erfolgte der Medienwechsel alle zwei Tage, anschließend zweimal in der Woche. Vor jedem Medienwechsel wurde eine lichtmikroskopische Kontrolle auf Adhärenz, Konfluenz und Vitalität der Zellen durchgeführt.

4.3 Subkultivierung

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurde das alte Medium entfernt und die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend folgte das Detachment der adhärennten Keratinozyten durch den Einsatz von 0,25%igen Trypsin-EDTA (5 Minuten bei 37°C). Die enzymatische Verdauungsreaktion wurde anschließend durch Zugabe serumhaltigen Kulturmediums gestoppt und die Zellsuspension bei 1100 U/Min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Zellpellet in 5 mL Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte mittels Neubaur-Zählkammer, sodass die Zellen mit einer Zelldichte von ca. 10^4 - 10^5 Zellen/mL ausplattiert werden konnten.

4.4 Kryokonservierung

4.4.1 Einfrieren der Zellen

Zellen verschiedener Passagen wurden zwecks Konservierung eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei -197°C gelagert. Hierfür wurde eine Einfrierlösung basierend auf FKS gewählt, der 10% DMSO zur Verhinderung der Eiskristallbildung zugesetzt wurde. Die Einfrierlösung und die entsprechenden Kryoröhrchen wurden bis zur unmittelbaren Verwendung auf Eis gelagert. Die Zellen wurden wie unter Punkt 4.3 beschrieben mit Trypsin-EDTA vom Zellboden gelöst und zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde anschließend mit der Einfrierlösung resuspendiert, sodass eine Zelldichte von 10^6 - 10^7 Zellen/mL erreicht wurde. Die Kryoröhrchen wurden mit 1 mL Zellsuspension/Röhrchen gefüllt und umgehend in den vorgekühlten Mr. Frosty™ Freezing Container verbracht, in dem eine Abkühlung der Proben von etwa

1°C/Minute erreicht werden kann. So können die Kryoröhrchen bei -80°C im Tiefkühlschrank über Nacht bis zu mehreren Tagen aufbewahrt und schließlich in den flüssigen Stickstoff überführt und bei -197°C gelagert werden.

4.4.2 Auftauen der Zellen

Um eine verbesserte Adhärenz der Keratinozyten zu erreichen und das Wachstum von noch verbliebenen Fibroblasten zu verhindern, wurde nach dem Auftauen der Keratinozyten das Keratinozytenmedium verwendet.

Da das Auftauen der Zellen rasch erfolgen muss, wurden die entsprechenden Kryoröhrchen unverzüglich im 37°C temperierten Wasserbad aufgetaut, bis keine Eiskristalle mehr vorhanden waren. Unter der Reinraumwerkbank wurde die Zellsuspension in 10 mL des erwärmten Kulturmediums (10% FKS) gegeben und bei 1100 U/Min fünf Minuten zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und schließlich mit einer Zelldichte von 10^4 - 10^5 Zellen/mL ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mikroskopisch auf Vitalität und Adhärenz untersucht und ein erster Medienwechsel durchgeführt.

4.5 Immunzytochemische Charakterisierung

Die Immunzytochemie macht sich die Spezifität von Antikörpern zunutze, um die für eine bestimmte Zellart charakteristischen Epitope nachzuweisen, und kann somit zur Charakterisierung isolierter Zellen eingesetzt werden. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Hier wurde die indirekte Immunfluoreszenzmethode gewählt, bei der sich zuerst ein spezifischer Primärantikörper an bestimmte Epitope der Keratinozyten bindet. Anschließend folgt die Bindung eines immunfluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers, der mithilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops detektiert werden kann.

Für die Charakterisierung der isolierten Keratinozyten wurden als Primärantikörper zum einen der Monoclonal Anti-Pan Cytokeratin Antikörper und zum anderen der Keratin HMW Ab-3 Antikörper verwendet (siehe Tab. 4.1). Zusätzlich wurden die im weiteren Verlauf in der Proteindetektion verwendeten Primärantikörper Polyclonal Anti-IVL und Polyclonal Anti-LOR mittels Immunfluoreszenznachweis getestet.

4.5.1 Immunzytochemische Färbung

Die immunzytochemische Charakterisierung wurde durchgeführt, nachdem die isolierten Keratinozyten adhärten und in Kultur proliferierten. Dafür wurden die bovinen Keratinozyten in einer Zelldichte von $10^4/\text{mL}$ pro Well einer 12-Well-Zellkulturplatte auf Deckgläschen ausplattiert.

Für die immunzytochemische Untersuchung wurden die kultivierten Keratinozyten zunächst für zehn Minuten mit 4%igen Paraformaldehyd fixiert und anschließend dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend fand die 30-minütige Inkubation mit einem 0,3% Triton[®] X-100-haltigen Blockingpuffer statt. Damit wurde zum einen durch das Triton[®] X-100 die Permeabilisierung der Zellmembranen erreicht und zum anderen durch das Ziegennormalserum das Blockieren unspezifischer Bindestellen. Nach Entfernung des Blockingpuffers erfolgte die Inkubation der Keratinozyten mit dem Primärantikörper über Nacht und bei 4°C. Dafür wurden die in Tab. 4.1 aufgeführten Primärantikörper in den angegebenen Konzentrationen verwendet. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen nach dreimaligem Waschvorgang mit PBS mit dem entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tab. 4.2) für eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Parallel dazu erfolgte die Kernfärbung mittels Hoechst (bisbenzimide H 33342 trihydrochlorid), einem Fluoreszenzfarbstoff zum Anfärben der DNA. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Fluoromount überschichtet und mit Deckgläschen eingedeckt.

Tab. 4.1 Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Klon	Verdünnung	Zellen
Monoclonal anti-Pan Cytokeratin Antikörper	CK 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18	1:100	Keratinozyten
Keratin HMW Ab-3	CK 1, 5, 10 und 14	1:100	Keratinozyten
Polyclonal anti-Involukrin (IVL)	Involukrin	1:100	Keratinozyten
Polyclonal anti-Lorikrin (LOR)	Lorikrin	1:100	Keratinozyten

Tab. 4.2 Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Klon	Speziesreaktivität	Verdünnung
Ziege anti-Maus IgG (H+L)-Cy3	polyklonal	Maus	1:500
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-Alexa Fluor 488	polyklonal	Kaninchen	1:500

4.6 In-vitro-Ischämiemodell

Im Folgenden wird zum einen die Durchführung und Etablierung des In-vitro-Ischämiemodells erläutert, zum anderen die sich anschließenden Untersuchungen, die eine morphologische Analyse der Keratinozyten, Vitalitätsmessungen und eine Detektion der Proteinexpression umfassten.

4.6.1 Durchführung des In-vitro-Ischämiemodells

Die Ischämieversuche wurden in einem oxygen-glucose-deprivation (OGD)-Modell durchgeführt. Dabei wurden die bovinen Keratinozyten über definierte Zeiträume einem Sauerstoff- und Glukosemangel ausgesetzt. Als weitere Bedingungen wurden außerdem die Hypoxie, die Inkubation mit glukosehaltigem Nährmedium bei reduzierter Sauerstoffkonzentration, und ein Glukoseentzug, die Inkubation mit glukosefreiem Nährmedium unter normoxischen Bedingungen, gewählt.

Zur Vorbereitung einer OGD wurden die Keratinozyten fünf Tage vor Versuchsbeginn auf die für die jeweilige Versuchsbedingung und Versuchsdauer vorgesehenen 96-Well-Platten ausplattiert. Zum Zeitpunkt Null eines Ischämieversuches, zu dem die Keratinozyten adhärent und konfluent waren, erfolgte bei allen Zellen mithilfe einer Mehrkanalpipette ein Medienwechsel, wobei die Kontrollzellen und Hypoxie-Zellen das Standardnährmedium mit Glukose und FKS erhielten, während die Zellen der OGD und des Glukoseentzuges mit glukosefreiem Medium versorgt wurden. Anschließend wurden die OGD- und Hypoxie-Zellen in den Hypoxie-Inkubator und die Kontroll- und GE-Zellen in den Standard-Inkubator verbracht. Nach der jeweiligen Expositionsdauer fand eine Reoxygenierung statt, d.h. ein anschließender Medienwechsel mit Standardmedium ohne FKS und eine Inkubation der Zellen für weitere 24 Stunden unter Standardbedingungen.

4.6.2 Gliederung der Ischämieversuche

Im Anschluss an die Durchführung der zwei Pilotstudien folgten die Hauptversuche, die sich in eine Kurzzeitanalyse über 96 Stunden und eine Langzeitanalyse über drei Wochen gliederten. Die Pilotstudie 1 wurde durchgeführt, um die für die geplanten Versuche benötigten Zeiträume, Kultivierungskonditionen und zu verwendenden Zelldichten herauszufinden. Hierfür wurde die OGD mit dazugehöriger Kontrolle, unter Standardbedingungen inkubierte Keratinozyten, über Zeiträume von 24, 48 und 72 Stunden und mit verschiedenen Zelldichten von 30.000, 40.000 und 50.000 Zellen/Well durchgeführt. Da in der Literatur Uneinigkeit über die reale Sauerstoffkonzentration der Epidermis herrscht und diese unter anderem mit Werten von 0,5 bis 10% angegeben wird, aber andererseits Keratinozyten üblicherweise bei einer atmosphärischen Sauerstoffkonzentration von ca. 21% kultiviert werden, wurde die Pilotstudie 2 durchgeführt. Hier wurde eine Sauerstoffkonzentration von 5% gewählt, um das Zellverhalten mit dem der unter normoxischen Standardbedingungen kultivierten Keratinozyten vergleichen zu können.

In der Kurzzeituntersuchung des Hauptversuches wurden als Bedingungen die OGD, die Hypoxie und der Glukoseentzug (GE) sowie eine Expositionsdauer von 24, 48, 72 und 96 Stunden gewählt. In der Langzeituntersuchung wurden die Keratinozyten ebenfalls einer OGD, einer Hypoxie und einem Glukoseentzug ausgesetzt, jedoch über ein, zwei und drei Wochen.

In allen durchgeführten Versuchen wurden parallel zu den oben genannten Versuchsbedingungen und den jeweiligen Expositionzeiten Keratinozyten als Kontrolle unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 95% relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Außerdem wurden für jede Bedingung und jeden Zeitpunkt zehn technische Replikate gewählt.

4.7 Vitalitätstests

Nach erfolgter Reoxygenierung der Zellen über 24 Stunden wurden zur Untersuchung der Zellviabilität für jede Versuchsbedingung und alle Messzeitpunkte der LDH- und der MTT-Test durchgeführt.

4.7.1 Prinzip des LDH-Tests

Laktatdehydrogenase (LDH), ein intrazelluläres Enzym, ist im Zytoplasma vitaler Zellen zu finden. Das Prinzip des LDH-Tests beruht darauf, dass infolge einer Zell-

schädigung die Zellmembran für große Moleküle wie der LDH permeabel wird und diese somit extrazellulär in den Kulturüberstand freigesetzt wird. Die LDH-Aktivität wird photometrisch durch die Konzentrationsabnahme des zugegebenen Nikotinadenindinukleotids (NADH) gemessen. Der LDH-Test basiert auf der durch LDH vermittelten enzymatischen Umwandlung von Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Laktat und NADH^+ .

4.7.2 Durchführung des LDH-Tests

Die Durchführung des LDH-Tests erfolgte 24 Stunden nach der Reoxygenierung der Zellen. Dafür wurde der Zellüberstand mithilfe einer Mehrkanalpipette abgenommen und in demselben Schema auf eine neue Zellkulturplatte pipettiert. Die Überstände wurden bis zur Durchführung des Tests im CO_2 -Inkubator bei 37°C aufbewahrt. Die LDH-Reaktionslösung, bestehend aus Kaliumphosphatpuffer, NADH und Pyruvat, wurde vor jeder Messung frisch angefertigt und auf 37°C temperiert. Als Nächstes wurden pro Well 200 μL der Reaktionslösung in eine UV-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend jeweils 50 μL des Zellüberstandes hinzugegeben. Die Kinetikmessung erfolgte daraufhin 10 Minuten lang in einem Mikroplattenreader.

4.7.3 Prinzip des MTT-Tests

Um die Zellviabilität und damit die Aktivität der mitochondrialen und zytosolischen Dehydrogenasen untersuchen zu können, kann der MTT-Test durchgeführt werden. Das Prinzip dieses Tests ist das Aufbrechen des Tetrazoliumringes des schwach gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) durch das Succinat-Tetrazolium-Reductase-System lebender Zellen. Als Resultat entsteht das wasserunlösliche und dunkelblau gefärbte Formazan.

4.7.4 Durchführung des MTT-Tests

Für die Durchführung des MTT-Tests wurde die MTT-Lösung frisch angefertigt und auf 37°C temperiert. Da die LDH- und MTT-Messungen kombiniert erfolgten, wurden unmittelbar nach Abnahme des Zellüberstandes für den LDH-Test 60 μL der MTT-Lösung pro Well auf die Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation der Zellen für vier Stunden bei 37°C . Anschließend wurden 40 μL Lysispuffer pro Well hinzugegeben und die Zellen über Nacht inkubiert, um das in den vitalen Zellen gebildete Formazan

in den Überstand freizusetzen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte schließlich im Mikroplatten-Reader bei 570 nm und 37°C.

4.8 Nachweis der Expression terminaler Differenzierungsmarker

Um mögliche ischämisch bedingte Veränderungen im Expressionsprofil der Keratinozyten feststellen zu können, wurden außerdem im Anschluss an die Ischämieversuche eine SDS-PAGE und Western Blot-Analyse durchgeführt. Untersucht wurde die Expression von Involukrin und Lorikrin, beide Marker der terminalen Differenzierung. Als Versuchsbedingungen dienten die OGD, die Hypoxie und der Glukoseentzug, denen die Keratinozyten über 24, 48, 72 und 96 Stunden ausgesetzt wurden. Parallel wurden Keratinozyten unter Standardbedingungen als Kontrolle mitgeführt.

4.8.1 Herstellung der Zelllysate

Für die Herstellung der Zelllysate wurden die Keratinozyten in einer Zelldichte von 6.000 Zellen/cm² auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm² ausgesät. Dabei wurde das Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90% als Versuchsbeginn definiert. Nach Beendigung des Versuches wurde das Medium der Petrischalen abgenommen, 10 mL PBS pro Petrischale hinzugegeben und die Zellen mithilfe eines Zellschabers gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 4°C und 2500 U/Minute zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde anschließend abgenommen und das entstandene Zellpellet in 500 µL mRIPA-Lysispuffer resuspendiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit dem Lysispuffer in ein Eppendorf-Tube gegeben und eine Stunde bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Zelllysate bei 4°C und 13.000 U/Minute zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Tube verbracht, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für die BCA-Proteinmengenbestimmung wurden 50 µL des Zelllysates separat gelagert.

4.8.2 Proteinbestimmung mittels BCA Assay

Die Proteinbestimmung erfolgte mithilfe des BCA Protein Assays von pierce Thermo Scientific, einer kolorimetrischen Messung und quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes. Mithilfe dieser Methode findet zuerst basierend auf der Biuret-Reaktion eine Reduktion der Cu²⁺ durch Protein im alkalischen Milieu statt. Als Folge entsteht

ein blaufarbener Komplex. Anschließend reagiert das reduzierte Kupfer mit dem spezifischen bicinchoninsäurehaltigen Reagenz, sodass ein violettfarbener wasserunlöslicher Komplex entsteht. Dieser wird kolorimetrisch bei 562 nm erfasst. Die Absorption zeigt eine lineare Steigung bei zunehmender Proteinkonzentration.

Die Proteinbestimmung wurde stets im Doppelansatz durchgeführt, um ein genaueres Ergebnis zu erzielen. Zunächst wurden auf einer 96-Well-Zellkulturplatte 200 μL des BCA-Reagenz vorgelegt, daraufhin 10 μL der Probenverdünnungen bzw. 10 μL des BSA-Standards hinzugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte auf einem Schüttler auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption mittels Mikroplatten-Reader bei 562 nm gemessen. Aus den gemessenen Absorptionswerten wurde schließlich eine Standardkurve erstellt, um die Proteinmenge der einzelnen Proben errechnen zu können.

4.8.3 SDS-PAGE

Mithilfe der SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), einer modifizierten Polyacrylamid-Gelelektrophorese, werden die Proteine der Molekülmasse nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Durch die Zugabe des Natriumdodecylsulfates werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgetrennt und mit SDS beladene Proteinkomplexe gebildet. Die Eigenladung der Proteine wird dadurch überdeckt, sodass alle Komplexe eine gleichmäßig negative Ladung aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE verwendet. Diese setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen, welche sich im pH-Wert, der Ionenzusammensetzung und der Porengröße unterscheiden. Zu Beginn müssen die Proteine das Sammelgel mit dem pH-Wert 6,8 durchqueren, damit sie zu einer Bande konzentriert werden können. Beim Übertreten in das Trenngel, das kleinere Poren und einen höheren pH-Wert von pH 8,8 aufweist, werden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt.

4.8.3.1 Probenvorbereitung

Um die Proteine auftrennen zu können, müssen diese zuerst verdünnt und denaturiert werden. Dafür wurden Probenverdünnungen, bestehend aus 5/6 Zelllysate und 1/6 Ladepuffer, hergestellt. Diese wurden anschließend fünf Minuten bei 100°C inkubiert. Die Probenverdünnungen wurden entweder direkt auf das Gel aufgetragen

oder bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert. Im weiteren Verlauf wurde eine Proteinmenge von 30 µg pro Slot verwendet.

4.8.3.2 Durchführung der SDS-PAGE

Die Glasplatten wurden vor Beginn gut gereinigt, zusammengesetzt und in den Gießstand eingesetzt. Es wurde ein Trenngel mit einer Konzentration von 10% und ein Sammelgel mit einer Konzentration von 5% ausgewählt. Des Weiteren wurde eine Gel-Dicke von einem Millimeter und für die Proteinauftrennung zehn Slots pro Gel gewählt. Anschließend wurden die ermittelten Probenmengen und der Proteinmarker für die Bandenidentifikation in die Slots eingefüllt und die Proteine für 1 Stunde ± 15 Minuten bei 35 mA aufgetrennt.

Tab. 4.3 Zusammensetzung des Trenngels (10%) für die SDS-PAGE

Gelbestandteile	Konzentration
ddH ₂ O	7,9 mL
30% Acrylamid Mix	6,7 mL
Tris-HCl pH 8,8	7,5 mL
10% SDS-Lösung	200 µL
10% APS	200 µL
TEMED	20 µL

Tab. 4.4 Zusammensetzung des Sammelgels (5%) für die SDS-PAGE

Gelbestandteile	Konzentration
ddH ₂ O	3,4 mL
30% Acrylamid Mix	0,83 mL
Tris-HCl pH 6,8	0,63 mL
10% SDS-Lösung	50 µL
10% APS	50 µL
TEMED	5 µL

4.8.4 Western Blot

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran, in diesem Fall eine Nitrocellulosemembran, fand im Anschluss mithilfe des Western Blots in einer Blotting-Kammer statt. Das Prinzip beruht auf der Wanderung der Proteine in Richtung Anode und somit auf die Membran, sodass das Muster der Proteinbanden beibehalten wird.

In dem hier verwendeten Sandwichmodell wurde das Gel luftblasenfrei auf die in Transferpuffer getränkte Nitrocellulosemembran gelegt und zwischen zwei Whatman-Papieren und zwei Schwämme gelegt. Dieser Aufbau wurde in die Gel-Halterkassetten eingeklemmt und zusammen mit dem Kühlakku in die Blotting-Kammer eingesetzt. Anschließend wurde die Kammer mit einem methanolhaltigen Transferpuffer aufgefüllt, um eine Lockerung der Protein-SDS-Bindung und eine verbesserte Membranbindung zu erreichen. Der Proteintransfer fand schließlich zwei Stunden bei 100 V in einer Kühlkammer statt.

4.8.5 Immunodetektion

Nach Abschluss des Proteintransfers fand der indirekte Nachweis der zu untersuchenden Proteinbanden mit einem antigenspezifischen Primärantikörper und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper statt, welche durch Lumineszenzmikroskopie detektiert werden konnten. Um unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurden die Membranen vorab mit einem 3%igen Blockingpuffer auf Milchpulverbasis eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit dem ersten Primärantikörper in einer Konzentration von 1:200 über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor der Zugabe des Sekundärantikörpers erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit TBS-T. Der Sekundärantikörper wurde anschließend für zwei Stunden in einer Konzentration von 1:10.000 hinzugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Da ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet wurde, musste dieser durch Zugabe einer luminol- und wasserstoffperoxidhaltigen Entwicklerlösung behandelt werden. Dadurch wurde infolge einer enzymatischen Umsetzung ein lumineszierendes Produkt gebildet, dessen Signal anschließend gemessen wurde.

Da zwei Primärantikörper mit demselben Wirt Kaninchen und demnach demselben Sekundärantikörper verwendet wurden, konnten diese nur hintereinander auf der Membran zur Anwendung kommen. Um die Primär- und Sekundärantikörper der ersten Markierung zu entfernen, wurde das sogenannte Stripping durchgeführt. Die Membran wurde dafür 30 Minuten bei 37°C mit dem Stripping Buffer, bestehend aus

Glycin und Natriumchlorid, inkubiert. Im Anschluss daran konnte der zweite Primärantikörper wie bereits beschrieben verwendet werden.

Die densitometrische Auswertung zur Quantifizierung der Proteinbanden wurde schließlich mithilfe des Programmes ImageJ (Wayne Rasband, NIH) durchgeführt.

Tab. 4.5 Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Klon	Wirtsspezies	Verdünnung
Polyclonal anti-Involukrin (IVL)	Involukrin	Kaninchen	1:5000
Polyclonal anti-Lorikrin (LOR)	Lorikrin	Kaninchen	1:200
Maus anti- β -Aktin (β AKT)	AC-15	Maus	1:5000

Tab. 4.6 Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Klon	Speziesreaktivität	Verdünnung
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO	polyklonal	Kaninchen	1:5000
Schaf anti-Maus IgG (H+L)-HRPO	polyklonal	Maus	1:5000

4.9 Dokumentation

Die Kontrolle und Dokumentation des Zellwachstums erfolgte mithilfe des inversen Phasenkontrastmikroskops Nikon Eclipse TE 2000-S und der dazugehörigen NIS-Elements AR 3.2 Software (Nikon Instruments Europe B.V.).

Für die Detektion der Proteinbanden in der Western Blot-Analyse wurden das Lumineszenz-Dokumentationssystem Luminescent Image Analyzer CH mit der Software Image Reader LAS-1000 Pro V2.6 (Fujifilm Holdings K.K.) verwendet.

4.10 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der in den Vitalitätstests und in der Western Blot-Analyse gewonnenen Ergebnisse wurden die Programme Microsoft Excel 2010 und SigmaPlot 11.0 verwendet. Die Quantifizierung der im Western Blot gemessenen Proteinbanden wurde des Weiteren mithilfe des Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ 1.46 (Wayne Rasband, NIH) durchgeführt. Um die Ergebnisse untereinander vergleichen und interpretieren zu können, wurden die gewonnenen Daten auf die jeweiligen Kontrollen (100 %) normiert. Anschließend wurden sie zunächst dem Ausreißertest nach Grubbs unterzogen, um ihre Zuverlässigkeit überprüfen und mögliche Ausreißer eliminieren zu können. Für die Untersuchung der Mittelwertunterschiede mehrerer unterschiedlicher Stichproben wurde die einfaktorielle ANOVA sowie als Post-hoc-Test der Holm-Sidak-Test angewendet. Als statistisch signifikant wird dabei eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt.

5 Ergebnisse

Das vorliegende Kapitel ist in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wird die Isolation und Kultivierung der bovinen Keratinozyten aus der Klaue und ihre anschließende immunzytochemische Charakterisierung erläutert. Der zweite Abschnitt behandelt die Vitalitätsuntersuchungen der bovinen Keratinozyten im Kurz- und Langzeitversuch. Die Auswirkungen der OGD auf die Expression verschiedener Differenzierungsmarker werden schließlich im dritten Abschnitt aufgezeigt.

5.1 Kultivierung der bovinen Keratinozyten

5.1.1 Isolierung und Kultivierung

Die Isolierung der bovinen Keratinozyten aus der Klaue erfolgte nach der in Kapitel 4.1 beschriebenen Isolationsmethode, einem nach NEBEL (2005) modifizierten Isolationsprotokoll. Mithilfe dieses Isolationsprotokolls wurde eine hohe Ausbeute an vitalen Zellen erreicht, sodass diese in einer Zelldichte von 10^6 Zellen/mL im Keratinozytenmedium ausplattiert werden konnten. Lichtmikroskopisch konnten anschließend abgerundete und frei bewegliche Zellen im Medium beobachtet werden, die in den folgenden Stunden zu adhären beginnen und nach 24 Stunden erste Zellausläufer aufwiesen. 48 Stunden nach der Isolation zeichneten sich die Zellen durch deutliche Zellausläufer aus und neigten infolge von Zell-Zell-Kontakten untereinander zur Ausbildung von Zellkolonien (vgl. Abb. 5.1).

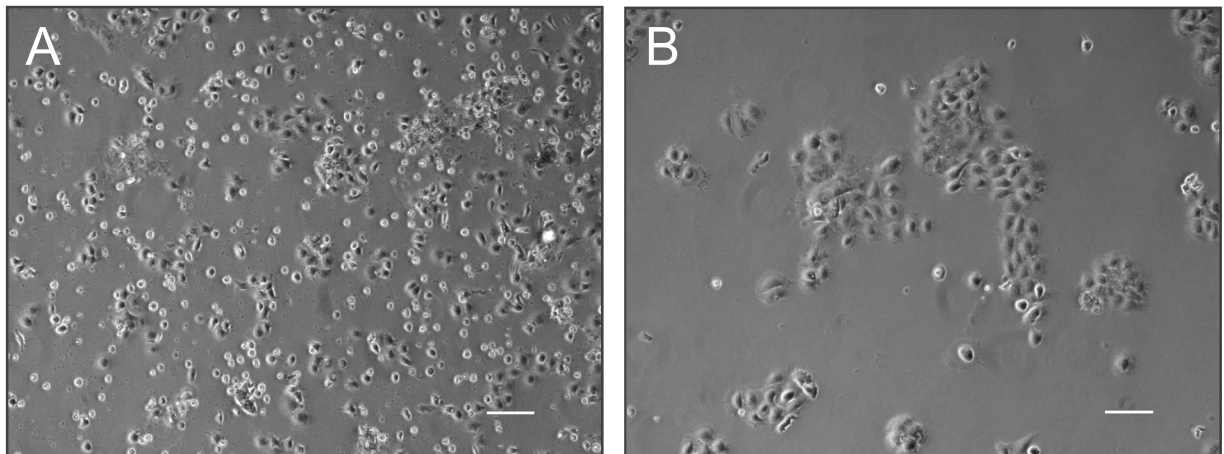


Abb. 5.1 Primärkultur nach Isolation aus der Klauenepidermis. A. 2 Tage nach Isolation: Runde und frei bewegliche Zellen im Keratinozytenmedium sowie adhären Zellen mit kopfsteinartiger Morphologie und ersten Zellausläufern zu sehen. B. 4 Tage nach Isolation: Die adhären Zellen bilden Zellkolonien durch Zell-Zell-Kontakte und weisen Zellausläufer auf. Messbalken entsprechen 100 μ m.

Mikroskopisch konnten die Zellen anhand ihrer charakteristischen kopfsteinpflasterartigen Morphologie („cobblestone“) als Keratinozyten identifiziert werden. Im weiteren Verlauf wiesen die Zellkolonien eine vermehrte Proliferation auf, sodass sie an Größe zunahmen und schließlich nach zwei bis drei Wochen ein konfluenter Monolayer entstand. Infolge des verwendeten Keratinozytenmediums zeigte sich ein stark reduziertes Fibroblastenwachstum und damit ein geringerer Fibroblastengehalt, sodass ein Überwuchern der Keratinozyten verhindert und ein adäquates Keratinozytenwachstum gewährleistet werden konnte. Nach vier bis fünf Zellpassagen wurde schließlich eine Keratinozytenkultur mit hoher Reinheit erreicht.

5.1.2 Immunzytochemische Charakterisierung

Für die immunzytochemische Charakterisierung der in Kultur befindlichen Zellen wurden die in Kapitel 4.5 genannten Primärantikörper verwendet. Zum einen wurde mit dem Anti-Pan Zytokeratin Antikörper die Expression der Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18 und zum anderen mit dem Keratin HMW Ab-3 Antikörper die Expression der Zytokeratine 1, 5, 10 und 14 nachgewiesen. Die kultivierten Zellen mit der charakteristischen kopfsteinpflasterartigen Morphologie konnten immunzytochemisch somit eindeutig als Keratinozyten identifiziert und von möglichen Fibroblasten abgegrenzt werden (vgl. Abb. 5.2). Weiterhin wurden die Antikörper Anti-Involukrin und Anti-Lorikrin vor der Verwendung in der Western Blot-Analyse immunzytochemisch getestet, um die Proteine Involukrin und Lorikrin in den kultivierten Keratinozyten nachweisen zu können. Der immunzytochemische Nachweis konnte eindeutig das Vorkommen von Involukrin und Lorikrin in den kultivierten Keratinozyten belegen (vgl. Abb. 5.3).

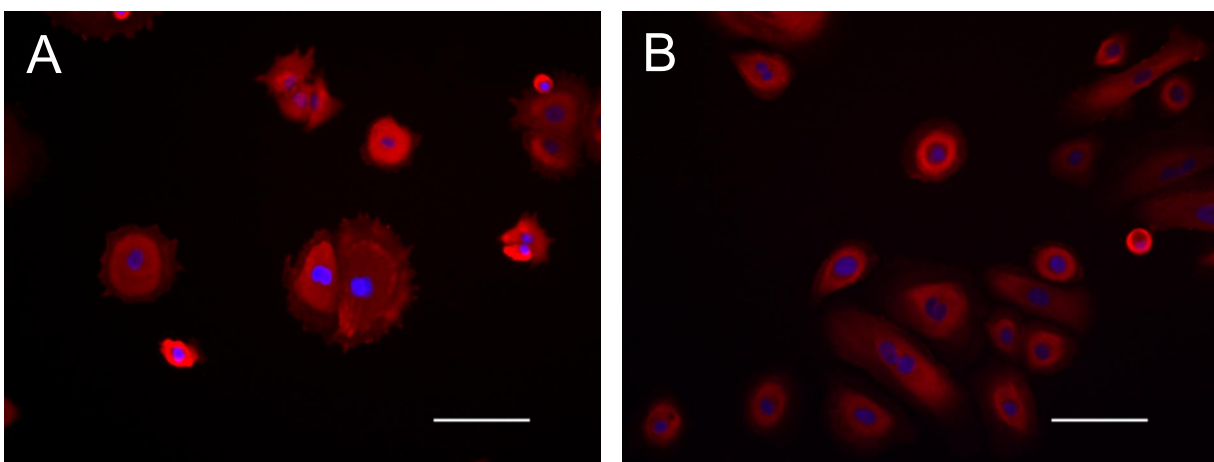


Abb. 5.2 Immunzytochemische Charakterisierung primärer Keratinozyten. Positive Markierung der zytoplasmatischen Zytokeratine. A. Verwendung des Monoklonal Anti-Pan Cytokeratin Antikörpers; B. Verwendung des Keratin HMW Ab-3 Antikörpers. Kernfärbung mit Hoechst 33342. Messbalken entsprechen 100 µm.

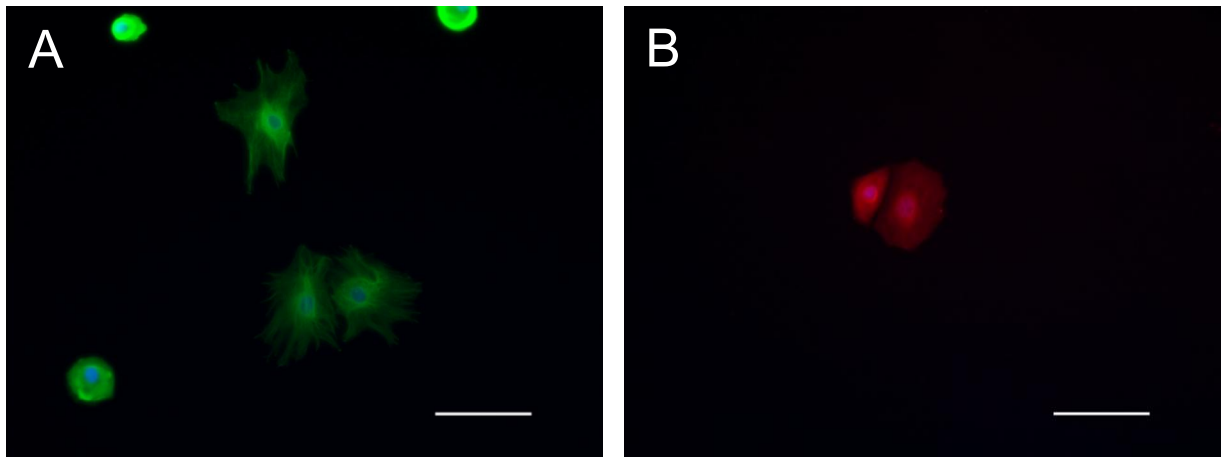


Abb. 5.3 Immunzytochemischer Nachweis terminaler Differenzierungsmarker. Positive Markierung mit A. Involukrin und B. Lorikrin. Kernfärbung mit Hoechst 33342. Messbalken entsprechen 100 μm .

5.2 Bestimmung der Zytotoxizität und Zellviabilität der Keratinozyten nach OGD-Exposition

5.2.1 Pilotstudie 1: Normoxie vs. OGD

Zu Beginn wurde die Pilotstudie 1 durchgeführt, um die Bedingungen für die nachfolgenden Versuche zu bestimmen. Für die Pilotstudie 1 wurden die Keratinozyten über 24, 48 und 72 Stunden einer OGD ausgesetzt. Anschließend fand nach einer 24-stündigen Reperfusion die Durchführung des LDH- und MTT-Assays statt. Eine Zelldichte von 30.000 Zellen pro Well auf 96 Well-Mikrotiterplatten erwies sich dabei in den Ischämieversuchen als geeignet, da einerseits ein Überwachsen der Keratinozyten nach der Ausplattierung der Zellen verhindert und andererseits auswertbare Ergebnisse in den Vitalitätsuntersuchungen erzielt werden konnten. Außerdem wurden pro Bedingung und Expositionsdauer zehn technische Replikate gewählt. Die Versuche wurden viermal wiederholt und die Ergebnisse schließlich auf die jeweilige Kontrolle normiert. Die Diagramme in Abb. 5.4 und 5.5 zeigen die Ergebnisse der LDH- und MTT-Messungen dieser vier Versuche.

Die zytotoxische Wirkung einer OGD auf die Keratinozyten wird in Abbildung 5.4 gezeigt. Nach 24-stündiger Exposition der Keratinozyten gegenüber der OGD kann eine signifikant erhöhte LDH-Freisetzung von 402,4% beobachtet werden. Darauf folgt im Verlauf der 72 Stunden ein signifikanter Abfall der gemessenen LDH-Aktivität auf 94,5%, welche damit niedriger als die der Kontrollgruppe ist. Im parallel dazu durchgeführten MTT-Test wurde die Zellviabilität der Keratinozyten nach erfolgter OGD untersucht (vgl. Abb. 5.5). Hier zeigten die Zellen 24 Stunden nach erfolgter

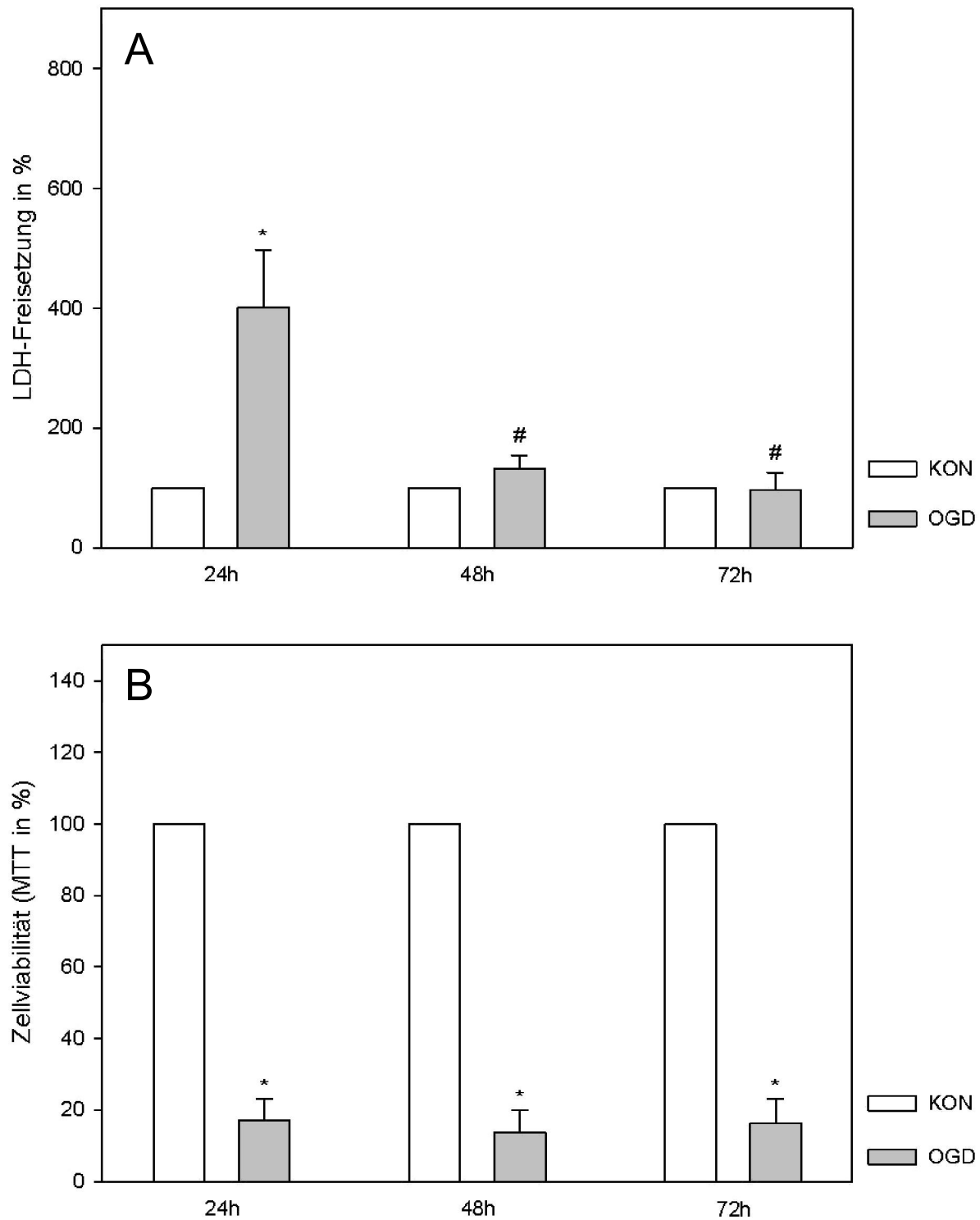


Abb. 5.4 Zytotoxische Effekte und Zellviabilität der Keratinozyten infolge einer oxygen glucose deprivation (OGD) nach 24h, 48h und 72h. Die Messung erfolgte nach 24-stündiger Reperfusion. Die LDH-Freisetzung wurde mittels LDH-Zytotoxizitätstest (A) und die Zellviabilität mittels MTT-Assay (B) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE aus vier voneinander unabhängigen Versuchen (n=4) mit jeweils 10 technischen Replikaten in Relation zur Kontrolle (KON=100%). * $P < 0,05$ vs. KON, # $P < 0,05$ vs. OGD 24h (einfaktorielle ANOVA).

OGD eine signifikant reduzierte Zellviabilität ($17,2\% \pm 5,9\%$, $P < 0,05$). Im weiteren Expositionsverlauf bleibt die Zellviabilität der Keratinozyten signifikant erniedrigt und weist einen konstanten Verlauf auf.

Da im LDH-Assay über die 72 Stunden ein starker Abfall der LDH-Aktivität beobachtet werden konnte, die unter die Werte der Kontrolle abfiel, wurde für die Kurzzeitanalyse der Hauptversuchsreihe eine Versuchsdauer von 96 Stunden gewählt, um den weiteren Verlauf beobachten zu können. Da außerdem ischämiebedingte Veränderungen in der Klauenepidermis während der Klauenreihe über einen deutlich längeren Zeitraum auftreten, wurde zusätzlich eine Langzeitbeobachtung über drei Wochen gewählt, um die zytotoxischen Effekte ischämischer Bedingungen über längere Versuchsdauern untersuchen zu können. Weiterhin werden in aktuellen Studien als ischämische Konditionen entweder eine Hypoxie oder ein Glukoseentzug angewendet, sodass in der Hauptstudie zusätzlich die Sauerstofftoleranz der Zellen infolge einer Hypoxie und die Glukosetoleranz infolge einer Hypoglykämie untersucht werden sollten.

5.2.2 Pilotstudie 2: Zellviabilität bei Sauerstoffkonzentration von 5% O₂

In der Literatur wird eine hypoxische Umgebung der Keratinozyten in der Epidermis beschrieben, jedoch variieren die Angaben über den tatsächlichen Sauerstoffgehalt (vgl. Kap. 2.1.2). Da aber in verschiedenen Studien die Keratinozyten unter normoxischen Bedingungen kultiviert werden, wurde für die Pilotstudie 2 eine Sauerstoffkonzentration von 5% gewählt, um die Zytotoxizität und Zellviabilität der Keratinozyten mit den unter normoxischen Bedingungen kultivierten Kontrollzellen vergleichen zu können. Untersucht wurden die Auswirkungen einer Hypoxie mit 5% O₂ sowie einer OGD bei 5% O₂.

Die einer hypoxischen Sauerstoffkonzentration von 5% ausgesetzten Keratinozyten zeigen im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine leicht erhöhte LDH-Freisetzung von 116,9% nach 24 Stunden (vgl. Abb. 5.6). Im Verlauf der 72-stündigen Exposition zeigt sich lediglich ein leichter Anstieg der LDH-Aktivität auf 123,7%, womit sich diese konstant im selben Bereich befindet. Im MTT-Assay zeigt die Zellviabilität relativ konstante Werte zwischen 104,2% nach einer 24-stündigen Hypoxie und 96,3% nach 72-stündiger Hypoxie (vgl. Abb. 5.7), womit kein signifikanter Unterschied zwischen der Hypoxie- und Kontrollgruppe festzustellen ist.

Bei einer OGD mit einer hypoxischen Sauerstoffkonzentration von 5% zeigen die Keratinozyten eine konstante LDH-Aktivität, die unter der Kontrollgruppe liegt, jedoch keinen signifikanten Unterschied darstellt. Im MTT-Test zeigte sich nach einer 24-stündigen OGD-Exposition eine gesteigerte Zellproliferation von 129,1%. Diesem

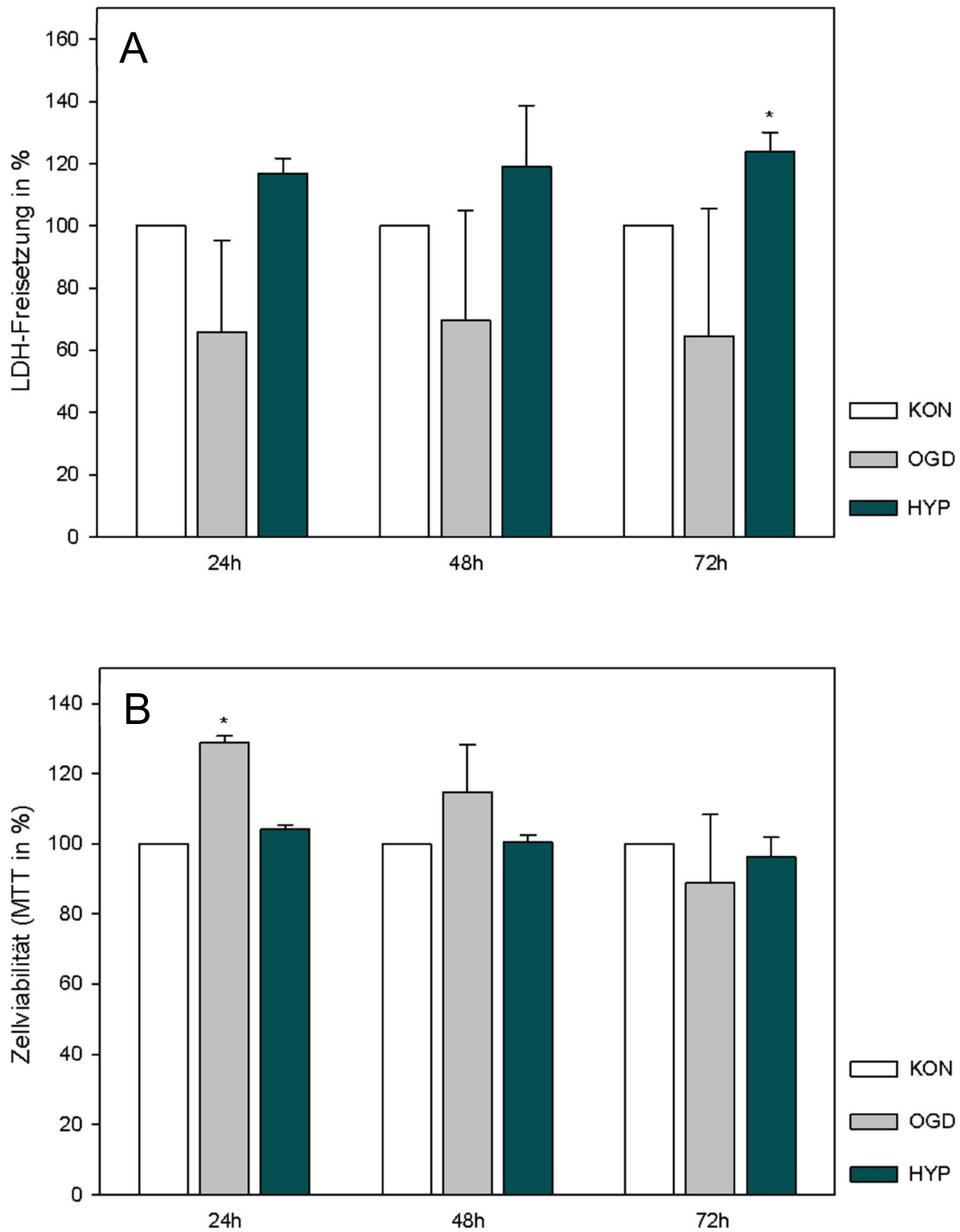


Abb. 5.5 Vergleich der zytotoxischen Effekte und Zellviabilität infolge des Einflusses hypoxischer (5% O₂) und normoxischer Sauerstoffbedingungen (21% O₂) auf die Keratinozyten. Als Bedingungen wurden die oxygen glucose deprivation (OGD) und die Hypoxie (HYP) über 24h, 48h und 72h im Vergleich zur Kontrolle bei 21% O₂ untersucht. Die Messung erfolgte nach 24-stündiger Reperfusion. Die LDH-Freisetzung wurde mittels LDH-Zytotoxizitätstest (A) und die Zellviabilität mittels MTT-Assay (B) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SE aus drei voneinander unabhängigen Versuchen (n=3) mit jeweils 10 technischen Replikaten in Relation zur Kontrolle (KON=100%). *P<0,05 vs. KON (einfaktorielle ANOVA).

Anstieg folgt ein Abfall der Zellviabilität, die nach 72 Stunden noch 88,6% beträgt und sich nicht signifikant von der der Kontrollgruppe unterscheidet.

Da das Proliferationsverhalten der Zellen bei einer Hypoxie von 5% Sauerstoff im Vergleich zu den Kontrollzellen keine deutliche Veränderung zeigte und die LDH-Werte während einer 72-stündigen Hypoxie weder signifikante Unterschiede noch Schwankungen abbildeten, wurden für die Kontrollgruppen in der Hauptstudie normoxische Standardbedingungen gewählt.

5.2.3 Hauptstudie

Die Hauptstudie gliedert sich zum einen in die Kurzzeitanalyse der Zellreaktionen nach Exposition gegenüber der OGD, der Hypoxie und dem Glukoseentzug über 96 Stunden sowie zum anderen die Langzeitanalyse der Zellviabilität über drei Wochen. Die getrennte Exposition der Keratinozyten gegenüber einer Hypoxie oder einem Glukoseentzug wurde zur Analyse der Sauerstoff- und Glukosetoleranz der Keratinozyten durchgeführt.

5.2.3.1 Kurzzeitanalyse über 96 Stunden

Um ein reproduzierbares In-vitro-Ischämiemodell etablieren zu können, wurden die Keratinozyten über verschiedene Zeiträume (24, 48, 72 und 96 Stunden) einer OGD, einer Hypoxie und einem Glukoseentzug ausgesetzt. Nach einer 24-stündigen Reperfusion folgte schließlich für jeden Versuch die Untersuchung der zytotoxischen Effekte mittels LDH-Assay und der Zellviabilität mittels MTT-Assay im Vergleich zu den unter Kontrollbedingungen kultivierten Keratinozyten (siehe Abb. 5.6). Für jeden Versuch wurden die Keratinozyten in einer Zelldichte von 30.000 Zellen pro Well auf einer 96 Well-Zellkulturplatte ausgesät und pro Bedingung und Expositionsdauer zehn technische Replikate gewählt. Um die Reproduzierbarkeit des Ischämiemodells gewährleisten zu können, wurden die Versuche jeweils dreimal wiederholt. In den Diagrammen der Abbildung 5.6 wird die Gesamtauswertung der LDH- und MTT-Assays der drei Wiederholungen dargestellt sowie in den Diagrammen der Abbildung 5.7 die einzelnen Versuche mit den jeweiligen technischen Replikaten.

In Abbildung 5.6 weist die OGD-Gruppe im LDH-Assay im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich erhöhte LDH-Aktivität auf ($259,0\% \pm 131,2\%$), die im weiteren zeitlichen Verlauf zwar abnimmt, aber im Vergleich zur Kontrolle erhöht bleibt. Des Weiteren zeigt die LDH-Aktivität der OGD-Gruppe nach 24 und 48 Stunden im Vergleich zu der Hypoxie- und GE-Gruppe die höchsten Werte. In der Einzelauswertung in Abbil-

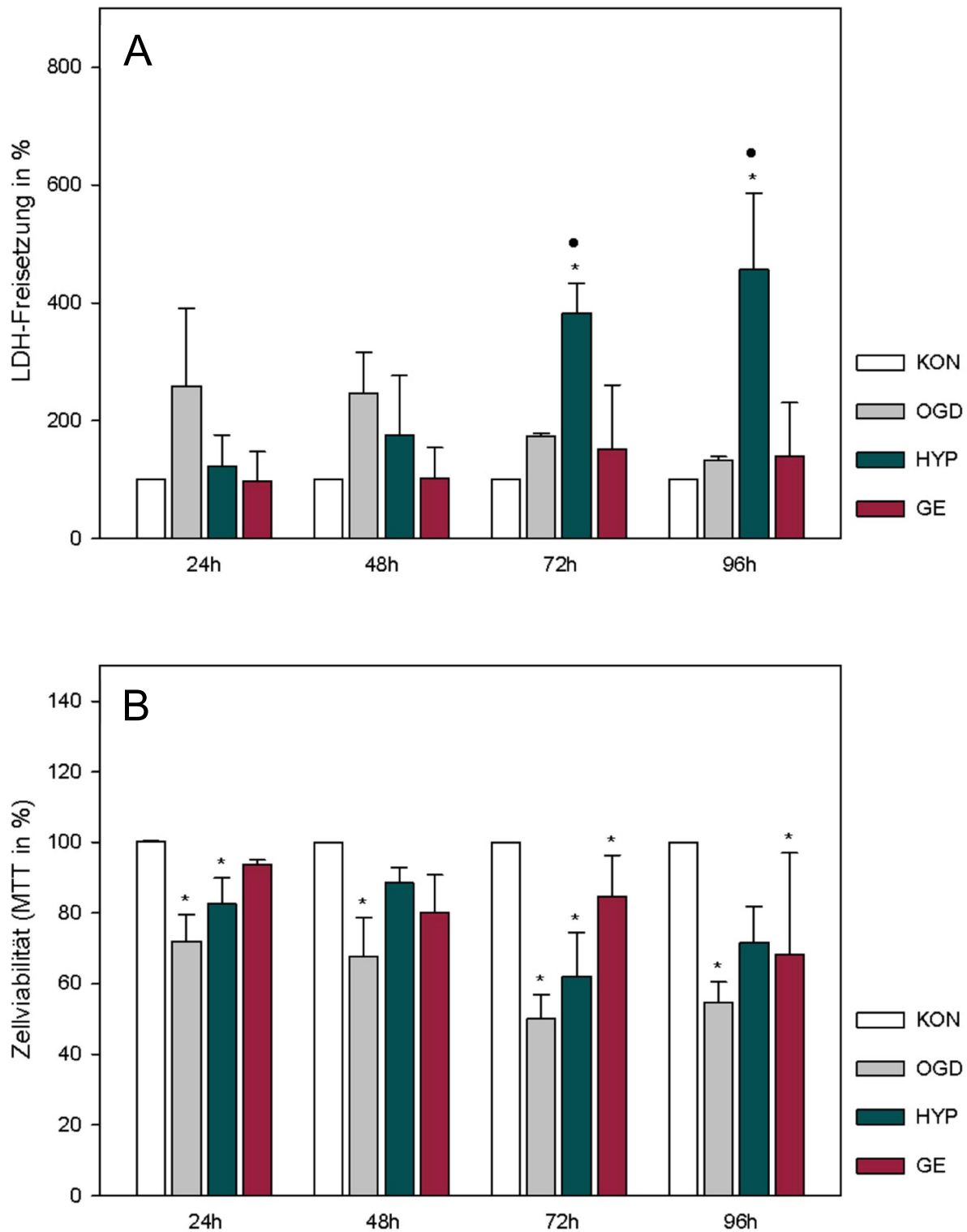


Abb. 5.6 LDH-Aktivität und Zellviabilität infolge der oxygen glucose deprivation (OGD), der Hypoxie (HYP) und des Glukoseentzugs (GE) nach 24h, 48h, 72h und 96h, Ergebnisse der drei wiederholten Versuche. Die LDH-Aktivität wurde mittels LDH-Zytotoxizitätstest (A) und die Zellviabilität mittels MTT-Assay (B) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE aus drei voneinander unabhängigen Versuchen (n=3) mit jeweils 10 technischen Replikaten in Relation zur Kontrolle (KON=100%). * P<0,05 vs. KON, • P<0,05 vs. HYP 24h (einfaktorielle ANOVA).

dung 5.7 A, C und E lässt sich erkennen, dass die LDH-Aktivität infolge einer Exposition gegenüber einer OGD deutlich erhöht ist und die LDH-Aktivitäten gegenüber der jeweiligen Kontrolle und innerhalb der OGD-Gruppe einen signifikanten Unterschied aufweisen. In Versuch 2 zeigt sich jedoch die höchste LDH-Aktivität erst nach einer Expositionsdauer von 48 Stunden. In Versuch 3 ist die LDH-Freisetzung ebenfalls signifikant erhöht, weist jedoch erst nach 96 Stunden einen Abfall auf.

Bei Betrachtung der Zellviabilität der OGD-Gruppe im MTT-Assay im Vergleich zur Kontrolle wird nach 24-stündiger Exposition eine signifikante Abnahme erkennbar ($72,0\% \pm 7,6\%$, $p < 0,05$) (siehe Abb. 5.6). Im Verlauf der 72 Stunden zeigt sich eine weitere Abnahme, bis die Zellviabilität nach 96 Stunden schließlich auf $54,5\%$ ($p < 0,05$) ansteigt. In der Einzelbetrachtung der MTT-Untersuchungen variiert jedoch die Zellviabilität (siehe Abb. 5.7 B, D, F). In allen drei Versuchen kann eine signifikante Abnahme gegenüber der Zellviabilität der Kontrollzellen sowie ein signifikanter Unterschied innerhalb der OGD-Gruppe verzeichnet werden. In Versuch 1 ist nach 24-stündiger OGD eine signifikante Viabilitätsabnahme auf $58,7\%$ zu sehen, die nach 72 Stunden einen signifikanten Anstieg ($63,9\% \pm 1,3\%$, $p < 0,05$) zeigt. Dahingegen ist die Zellviabilität in Versuch 2 nach 24 Stunden deutlich höher und zeigt im Laufe der 96-stündigen Expositionsdauer eine zeitabhängige Abnahme ($43,3\% \pm 0,5\%$, $p < 0,05$). In Versuch 3 kann ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen der OGD- und Kontrollgruppe beobachtet werden, jedoch zeigt die Zellviabilität deutliche Schwankungen. Es kann aber zusammenfassend beobachtet werden, dass eine Exposition gegenüber der OGD zu einem deutlichen zytotoxischen Effekt in den Keratinozyten und eine signifikante Abnahme der Zellviabilität hervorruft. Zum anderen zeigt sich bei vergleichender Betrachtung des LDH- und MTT-Assays, dass bei einer deutlich erhöhten LDH-Aktivität die Zellviabilität im MTT-Test zu demselben Zeitpunkt eine signifikante Abnahme zeigt, die in den nächsten 24 Stunden weiterhin sinkt.

Nach 24-stündiger Exposition gegenüber einer Hypoxie zeigen die Keratinozyten in der Gesamtauswertung des LDH-Assays im Vergleich zur Kontrolle lediglich eine leichte Erhöhung der LDH-Aktivität (siehe Abb. 5.6). Diese nimmt im weiteren Versuchsablauf zeitabhängig zu, sodass nach 96 Stunden die höchste Aktivität von $456,5\%$ beobachtet werden kann, die sowohl gegenüber der Kontrolle sowie innerhalb der Hypoxie-Gruppe einen signifikanten Unterschied zeigt. In der Einzelauswertung in Abbildung 5.7 zeigen die Versuche 1 und 2 dieselbe zeitabhängige Zunahme der LDH-Aktivität mit der höchsten LDH-Aktivität nach 96 Stunden. In Versuch 2 beginnt dieser Anstieg nach 24-stündiger Exposition jedoch mit einer im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringerten LDH-Aktivität ($61,6\% \pm 2,1\%$, $p < 0,05$). In Versuch 3 ist nach 24 Stunden ebenfalls eine signifikant erniedrigte LDH-Freisetzung zu erkennen. Jedoch sind hier im weiteren Verlauf Abweichungen zu beobachten, da nach ei-

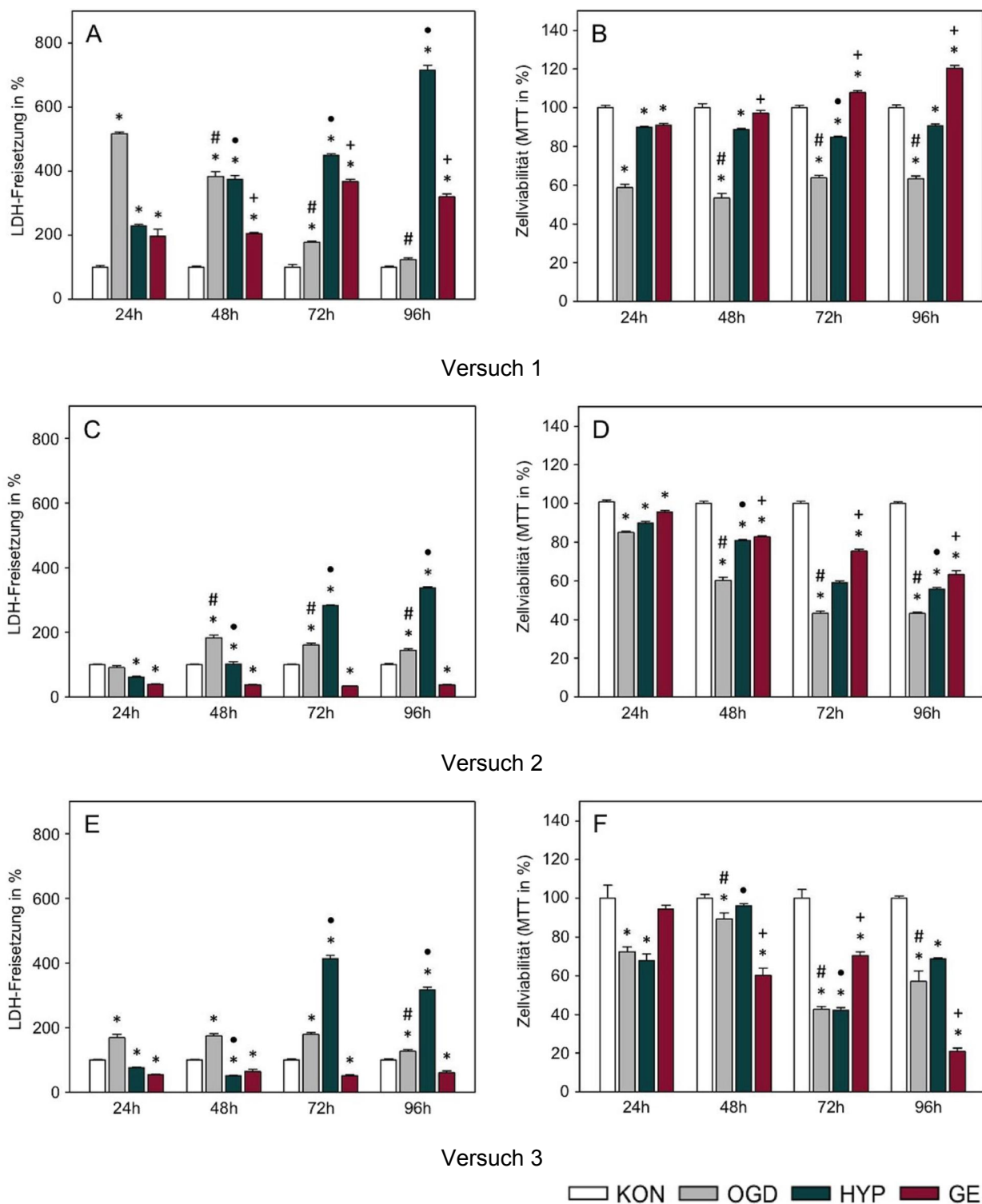


Abb. 5.7 LDH-Aktivität und Zellviabilität infolge einer oxygen glucose deprivation (OGD), einer Hypoxie (HYP) und eines Glukoseentzugs (GE) nach 24h, 48h, 72h und 96h. Die Messung erfolgte nach 24-stündiger Reperfusion. Die LDH-Aktivität wurde mittels LDH-Zytotoxizitätstest und die Zellviabilität mittels MTT-Assay gemessen. Die Diagramme A, C und E veranschaulichen die Ergebnisse des LDH-Assays dreier wiederholter Versuche sowie B, D und F die dazugehörigen Ergebnisse des MTT-Assays derselben Versuche. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE aus zehn technischen Replikaten ($n=10$) in Relation zur Kontrolle (KON=100%). * $P<0,05$ vs. KON, # $P<0,05$ vs. OGD 24h, • $P<0,05$ vs. HYP 24h, + $P<0,05$ vs. GE 24h (einfaktorielle ANOVA).

nem weiteren leichten Abfall nach 72 Stunden die höchste LDH-Aktivität von 413,8% und schließlich nach 96 Stunden lediglich von 316,3% gemessen werden konnte. Auch hier sind signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen sowie innerhalb der Hypoxie-Gruppe zu erkennen.

Im MTT-Assay in Abbildung 5.6 (B) lässt sich infolge einer Hypoxie eine erniedrigte Zellviabilität erkennen, die jedoch im zeitlichen Verlauf Schwankungen aufweist. Nach 24-stündiger Exposition lässt sich eine signifikant reduzierte Zellviabilität feststellen, die im weiteren Verlauf zunächst leicht zunimmt und nach 72 Stunden eine signifikante Abnahme auf 62,0% zeigt. Anschließend folgt eine leichte Viabilitätszunahme, welche im Vergleich zur Kontrolle noch immer erniedrigt ist. In der Einzelbetrachtung in Abbildung 5.7 zeigt sich in Versuch 1 eine signifikant verminderte Zellviabilität, die jedoch deutlich höher ist als die der OGD-Gruppe. Im Verlauf der 96 Stunden weist die Zellviabilität ein konstantes Verhalten und lediglich nach 72-stündiger Exposition einen signifikanten Unterschied innerhalb der Hypoxie-Gruppe auf. Im zweiten Versuch lässt sich ebenfalls eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant verminderte Zellviabilität erkennen, die sich im Verlauf der 96 Stunden signifikant auf 55,6% reduziert. Dieser Verlauf entspricht der zeitabhängigen Zunahme der LDH-Aktivität im entsprechenden LDH-Assay. Versuch 3 weist der OGD-Gruppe entsprechend ebenfalls Schwankungen der Zellviabilität auf.

Zusammenfassend zeigt die Hypoxie im LDH-Assay eine zeitabhängige Zunahme der zytotoxischen Effekte auf die Keratinozyten, die den Verlauf der OGD-Gruppe entgegengesetzt verläuft. Im MTT-Assay lässt sich eine verminderte Zellviabilität messen, die ebenfalls eine zeitabhängige Abnahme zeigt und damit den gemessenen Werten des LDH-Tests entspricht.

Wie in Abbildung 5.6 zu sehen ist, zeigen die Keratinozyten nach erfolgtem Glukoseentzug in den ersten 48 Stunden im LDH-Assay der Kontrollgruppe vergleichbare Werte, sodass kein Unterschied in der LDH-Freisetzung festgestellt werden kann. Nach 72 Stunden folgt schließlich ein Anstieg, sodass die LDH-Aktivität nach 96 Stunden 139,8% beträgt. In der Einzelbetrachtung weicht Versuch 1 deutlich von den anderen beiden Versuchen ab (vgl. Abb. 5.7). Hier sind signifikant erhöhte Werte zu erkennen, die im Zeitverlauf nach 72 Stunden den höchsten Anstieg zeigen ($368,7\% \pm 5,3\%$, $p < 0,05$). In Versuch 2 und 3 hingegen lassen sich im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigte LDH-Aktivitäten messen, die im Verlauf der 96 Stunden relativ konstant bleiben.

Der MTT-Test zeigt in Abbildung 5.6 nach erfolgtem Glukoseentzug eine reduzierte Zellviabilität, die ebenfalls Schwankungen im zeitlichen Verlauf aufweist. In der Einzelbetrachtung (siehe Abb. 5.7) weicht ebenfalls der erste Versuch von den Versuchen 2 und 3 ab und zeigt nach einem 24-stündigen Glukoseentzug eine signifikante

Abnahme der Zellviabilität ($91,1 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$). Im Verlauf der 96-stündigen Expositionsdauer kann infolge einer zunehmenden Zellproliferation ein signifikanter Anstieg beobachtet werden, sodass nach 96 Stunden eine Zellviabilität von 120,4% erreicht wird. Versuch 2 zeigt eine signifikante Abnahme der Zellviabilität nach 24 Stunden, die in Abhängigkeit der Expositionsdauer einen konstanten Abfall auf 63,3% nach 96 Stunden und damit einen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppe zeigt. Der MTT-Test des dritten Versuchs zeigt ebenfalls Schwankungen in der Zellviabilität. Aber auch hier ist die Zellviabilität signifikant erniedrigt und zeigt auch innerhalb der Gruppe einen signifikanten Unterschied. Infolge eines Glukoseentzuges lässt sich eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der LDH- und MTT-Tests erkennen, da hier einerseits die LDH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt ist, was auf einen geringeren zytotoxischen Effekt hinweisen kann, und andererseits die Zellviabilität im MTT-Test signifikant abnimmt, was auf eine verminderte metabolische Leistung der Zellen oder auf eine reduzierte Überlebensfähigkeit der Keratinozyten hinweisen kann.

Der LDH-Assay zeigt demnach für jede Bedingung deutlich einen zeitlichen Verlauf der zytotoxischen Effekte. Die Keratinozyten zeigen infolge einer OGD ab dem Expositionsbeginn eine deutlich erhöhte LDH-Aktivität und damit eine zytotoxische Schädigung. Infolge einer Hypoxie kommt es zu einer Zunahme der LDH-Freisetzung über die 96 Stunden, sodass der größte zytotoxische Effekt nach Versuchsende beobachtet werden kann. Der Glukoseentzug zeigte im Vergleich zu den Kontrollzellen die geringste LDH-Aktivität auf. Im MTT-Test ist eine Variabilität zwischen den einzelnen Wiederholungen desselben Versuches zu erkennen. Einerseits zeigt sich hier der deutliche Effekt auf die Zellviabilität, der den Ergebnissen des LDH-Tests entspricht, andererseits wird deutlich, dass mithilfe des MTT-Tests keine zuverlässige Aussage über das Proliferationsverhalten und die Zellviabilität der Keratinozyten infolge einer Ischämie gemacht werden kann.

Morphologische Veränderungen:

Um die Ergebnisse der LDH- und MTT-Messungen zu stützen, wurden zusätzlich die morphologischen Veränderungen der Keratinozyten infolge der ischämischen Bedingungen dokumentiert. Sie sind in Abbildung 5.8 dargestellt.

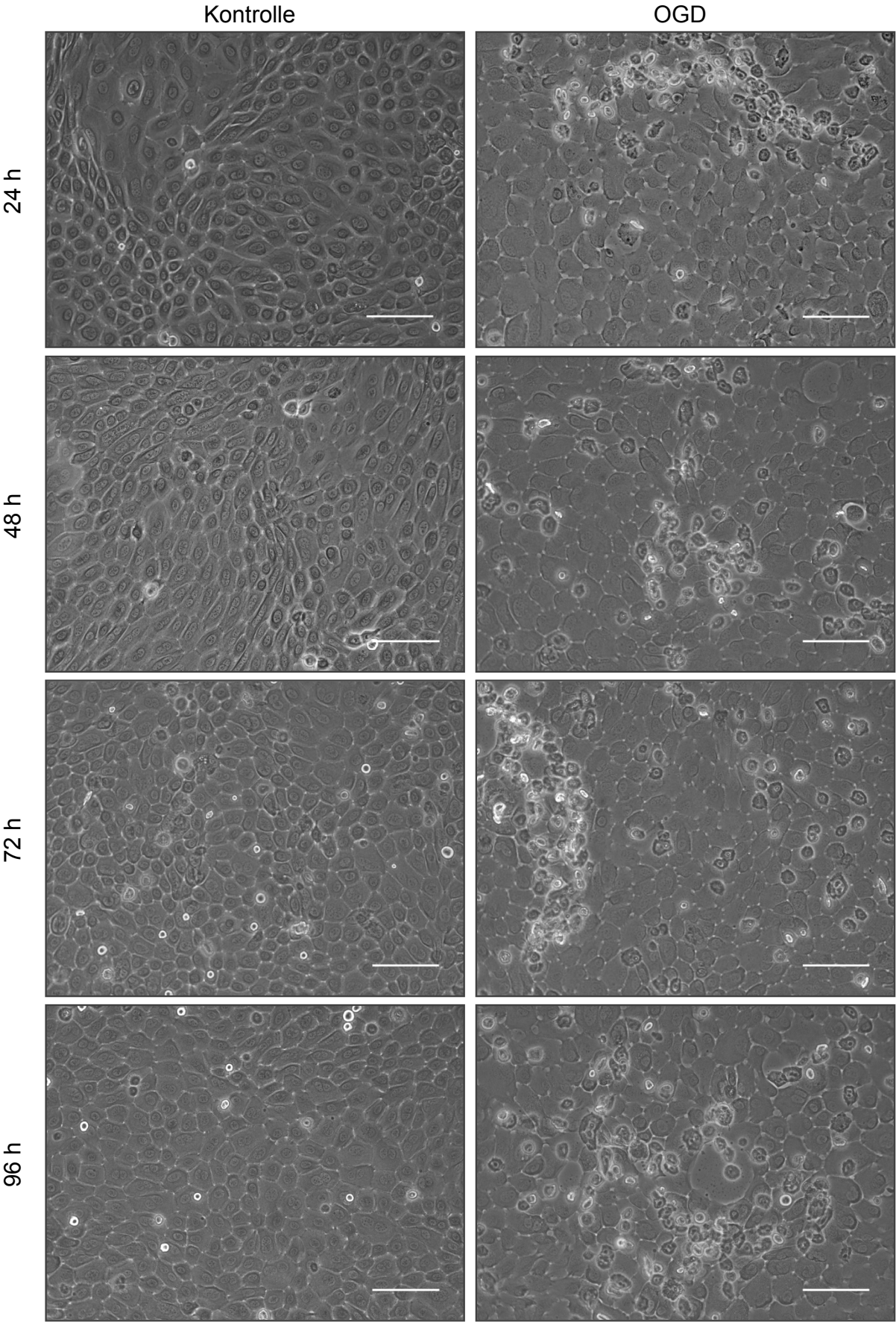
Die morphologischen Veränderungen nach erfolgter Exposition gegenüber einer OGD nehmen mit zunehmender Expositionsdauer zu und umfassen eine Erweiterung der Zellzwischenräume und eine beginnende Auflösung des Zellrasens infolge sterbender Zellen im Zellverband. Weiterhin treten apoptotische Zellen auf, erkennbar durch Zellschrumpfung, Karyopyknose und Verlust von Zellkontakten. Die dege-

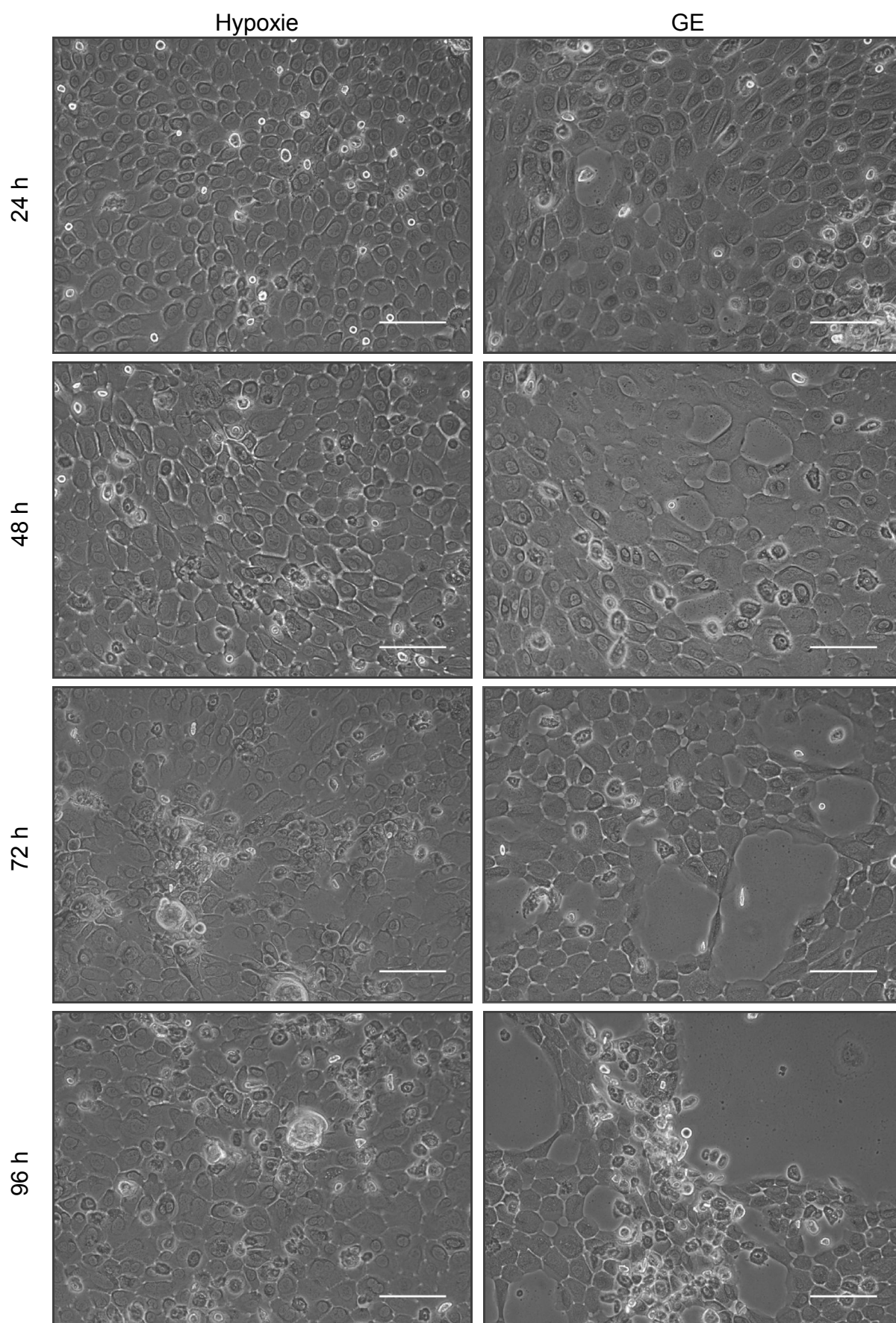
nerativen Effekte nach 24 Stunden sind in der OGD-Gruppe am stärksten. Infolge einer Hypoxie nehmen die morphologischen Zellveränderungen ebenfalls zeitabhängig zu, sind jedoch im Vergleich zur OGD schwächer ausgebildet. Charakteristisch sind das zunehmende Auftreten apoptotischer Zellen, erweiterte Zellzwischenräume und eine beginnende Stratifizierung, die erst nach 72 Stunden zu sehen ist. Der Zellrasen zeichnet sich zudem auch nach 96 Stunden noch durch seine hohe Zelldichte und Konfluenz aus.

Auf den Glukoseentzug reagieren die Keratinozyten morphologisch mit stark erweiterten Zellzwischenräumen und einer zunehmenden Auflösung des Zellrasens. Dieser weist außerdem eine reduzierte Zelldichte und gestreckte Keratinozyten auf. Ein weiteres Merkmal ist hier ebenfalls die beginnende Stratifizierung sowie das Auftreten apoptotischer Zellen. Im Vergleich zur OGD- und Hypoxie-Gruppe treten infolge eines Glukoseentzugs die massivsten Veränderungen in der Zellmorphologie auf.

Folgende Seiten:

Abb. 5.8 Exposition der bovinen Keratinozyten gegenüber Kontrollbedingungen, oxygen glucose deprivation (OGD), Hypoxie (HYP) und Glukoseentzug (GE) über 24h, 48h, 72h und 96h. Kontrolle: Keratinozyten wachsen zu einem konfluenten Monolayer und weisen kopfsteinpflasterartige Morphologie mit dominantem Nukleus auf. OGD: Bereits nach 24h tote Zellen mit Karyopyknose sichtbar, Zellzwischenräume verbreitert, Auflösung des Zellrasens mit Zelldetritus. Hypoxie: Nach 24h vereinzelt tote Zellen, nach 96h erweiterte Zellzwischenräume, zunehmend tote Zellen mit Karyopyknose und beginnende Stratifizierung. GE: Zunehmend tote Zellen mit Karyopyknose sichtbar, beginnende Auflösung des Zellrasens mit Zelldetritus, erweiterte Zellzwischenräume, beginnende Stratifizierung. Messbalken entsprechen 100 µm.





5.2.3.2 Langzeitanalyse über drei Wochen

Da zum einen während einer subklinischen Klauenreihe die pathophysiologischen Veränderungen der Dermis mit daraus resultierender epidermaler Ischämie über mehrere Wochen andauern können und zum anderen die Hypoxie-Gruppe in der Kurzzeitanalyse eine Zunahme der LDH-Aktivität über 96 Stunden erkennen ließ sowie starke Schwankungen der Zellviabilität unter allen Bedingungen zu erkennen waren, wurde die Langzeituntersuchung der Keratinozyten durchgeführt. Hier wurden die Keratinozyten ebenfalls in einer Zelldichte von 30.000 Zellen pro Well auf einer 96 Well-Zellkulturplatte ausgesät und pro Bedingung und Expositionsdauer zehn technische Replikate gewählt. Die Versuche wurden jeweils dreimal wiederholt. Die Diagramme in Abbildung 5.9 stellen die Gesamtauswertung der drei Wiederholungen dar sowie in Abbildung 5.10 die Einzelauswertungen der jeweiligen Versuche mit den zehn technischen Replikaten.

Abbildung 5.9 zeigt, dass nach erfolgter Exposition gegenüber einer OGD die Keratinozyten eine signifikant erniedrigte LDH-Aktivität erkennen lassen, die nach einer Woche 31,1% beträgt und nach drei Wochen auf 1,0% absinkt. Bei Betrachtung der Einzelauswertungen wird dies bestätigt (vgl. Abb. 5.10 A, C, E). Die Daten der drei Versuche zeigen übereinstimmende Ergebnisse, wobei hier der signifikante Unterschied zur jeweiligen Kontrolle und innerhalb der Gruppe deutlich wird. Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigen nach einer Woche eine signifikant verminderte Zellviabilität, die im Laufe der dreiwöchigen Exposition gegenüber der OGD ebenfalls signifikant abnimmt und nach drei Wochen 2,2% erreicht (vgl. Abb. 5.9). Bei Betrachtung der einzeln ausgewerteten Versuche zeigen die Keratinozyten in allen Versuchen ähnliche Werte und dieselbe signifikante Abnahme der Zellviabilität (siehe Abb. 5.10 B, D, F). Zusammenfassend entsprechen die gemessenen LDH-Aktivitäten den Ergebnissen des MTT-Assays und weisen auf starke zytotoxische Effekte hin, in deren Folge die Gesamtzellzahl stark reduziert ist und somit eine verminderte LDH-Freisetzung und MTT-Umsetzung folgt.

Nach erfolgter Hypoxie ist die LDH-Aktivität in der Gesamtauswertung in Abbildung 5.9 nach der ersten Woche signifikant auf 245,9% erhöht und zeigt nach zweiwöchiger Expositionsdauer die höchste Aktivität von 537,0%. Anschließend folgt eine starke Aktivitätsabnahme auf 130,5%. Im Vergleich zu den anderen Versuchsbedingungen zeigt die Hypoxie-Gruppe die mit Abstand höchste LDH-Freisetzung. In der Einzelbetrachtung der Versuche kann dieser Verlauf bei den Versuchen 2 und 3 ebenfalls beobachtet werden (vgl. Abb. 5.10). Hier sind deutlich signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen und innerhalb der Hypoxie-Gruppe zu beobachten. Versuch 1 hingegen weicht davon ab. Hier sind in den ersten beiden Wochen signifikant

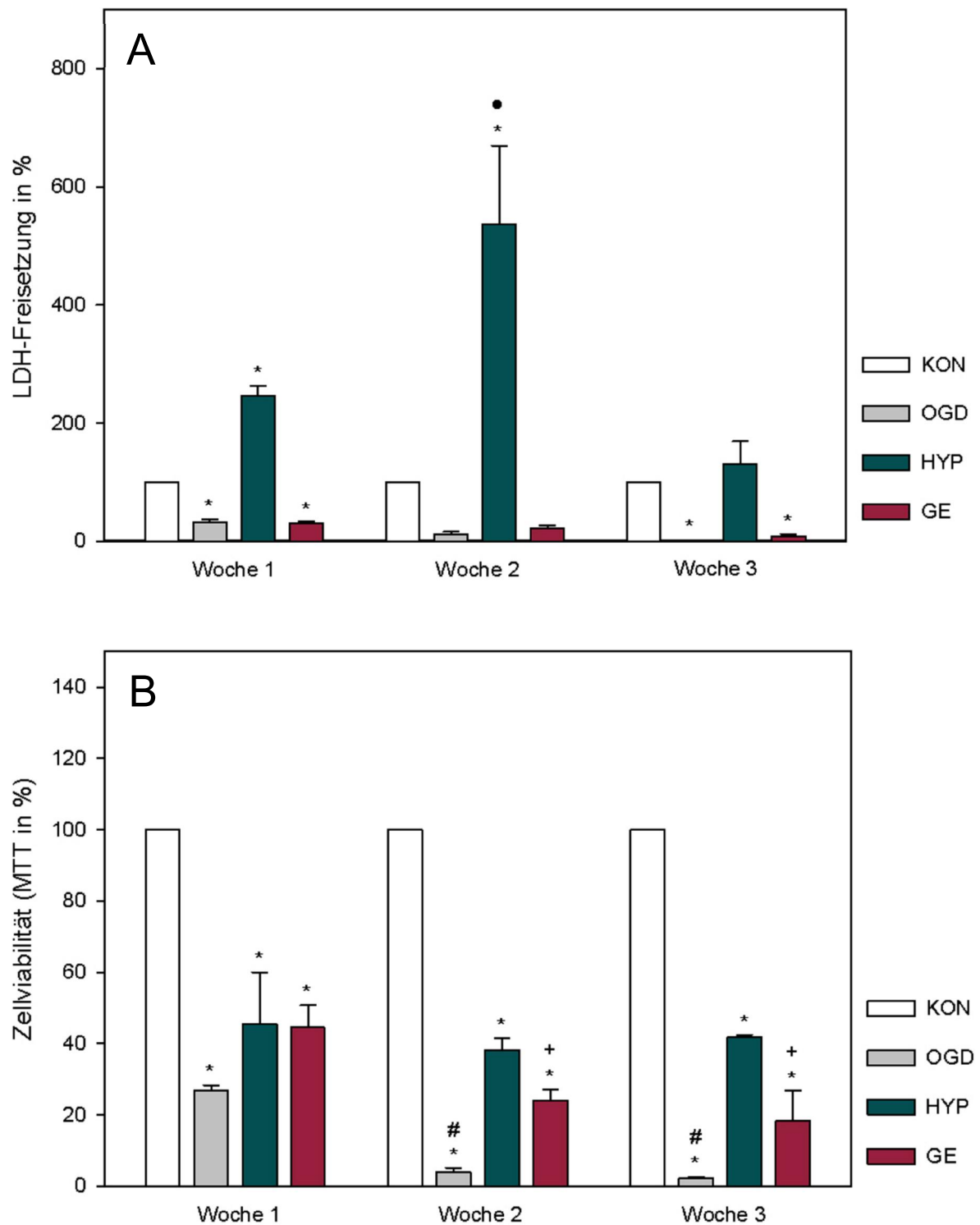


Abb. 5.9 LDH-Aktivität und Zellviabilität infolge der oxygen glucose deprivation (OGD), der Hypoxie (HYP) und des Glukoseentzugs (GE) nach ein, zwei und drei Wochen, Ergebnisse der drei Wiederholungen. Die LDH-Aktivität wurde mittels LDH-Zytotoxizitätstest (A) und die Zellviabilität mittels MTT-Assay (B) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE aus drei voneinander unabhängigen Versuchen ($n=3$) mit jeweils 10 technischen Replikaten in Relation zur Kontrolle (KON=100%). * $P<0,05$ vs. KON, # $P<0,05$ vs. OGD 24h, • $P<0,05$ vs. HYP 24h, + $P<0,05$ vs. GE 24h (einfaktorielle ANOVA).

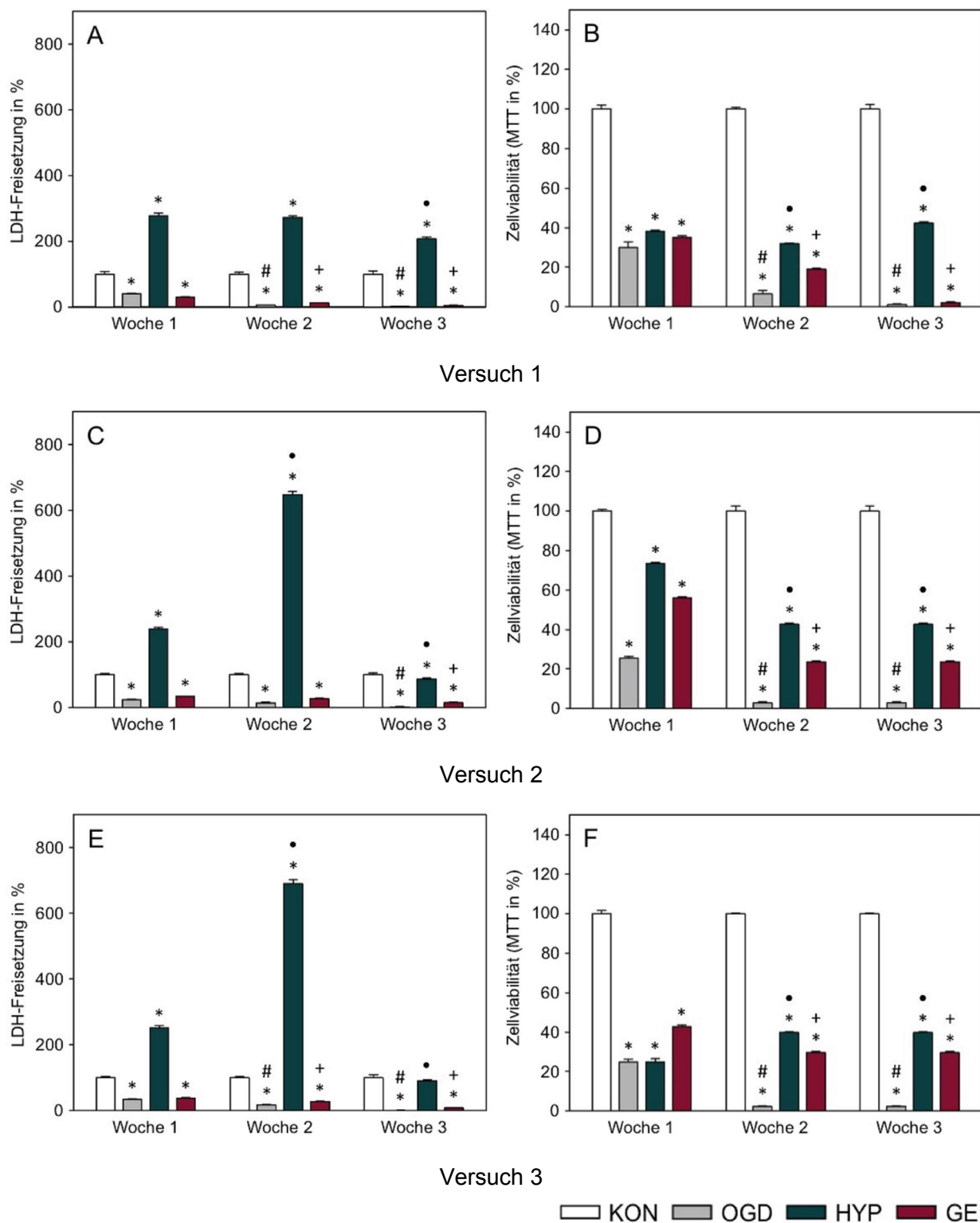


Abb. 5.10 LDH-Aktivität und Zellviabilität infolge einer oxygen glucose deprivation (OGD), einer Hypoxie (HYP) und eines Glukoseentzugs (GE) nach ein, zwei und drei Wochen. Die Messung erfolgte nach 24-stündiger Reperfusion. Die LDH-Aktivität wurde mittels LDH-Zytotoxizitätstest und die Zellviabilität mittels MTT-Assay gemessen. Die Diagramme A, C und E veranschaulichen die Ergebnisse des LDH-Assays dreier wiederholter Versuche sowie B, D und F die dazugehörigen Ergebnisse des MTT-Assays derselben Versuche. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE aus zehn technischen Replikaten ($n=10$) in Relation zur Kontrolle (KON=100%). * $P<0,05$ vs. KON, # $P<0,05$ vs. OGD 24h, • $P<0,05$ vs. HYP 24h, + $P<0,05$ vs. GE 24h (einfaktorielle ANOVA).

erhöhte Werte von 278,2% und 272,6% zu beobachten, die erst nach drei Wochen signifikant auf 207,5% abfallen. Auch hier sind die LDH-Aktivitäten im Vergleich zu den anderen Versuchsbedingungen deutlich höher.

In der Gesamtauswertung in Abbildung 5.9 ist die Zellviabilität infolge einer Hypoxie signifikant erniedrigt und zeigt einen konstanten Verlauf (45,5% nach einer Woche, 41,8% nach drei Wochen). Im Vergleich zu den einer OGD und einem Glukoseentzug ausgesetzten Keratinozyten zeigt die Hypoxie-Gruppe eine höhere Zellviabilität. In der Einzelbetrachtung der Versuche zeigen die Versuche 1 und 3 einen ähnlichen Verlauf mit variierenden Werten in derselben Höhe (vgl. Abb. 5.10). Lediglich Versuch 2 weicht davon ab, da hier nach einwöchiger Exposition gegenüber der Hypoxie zwar eine signifikant verminderte Zellviabilität zu sehen ist, diese jedoch mit 73,4% deutlich höher als in den Versuchen 1 und 3 liegt. Anschließend folgt ein Abfall der Viabilität auf 42,6%, welcher sich im Bereich der gemessenen Zellviabilitäten der anderen beiden Versuche befindet. Insgesamt kann demnach beobachtet werden, dass hier die Gesamtzellzahl noch deutlich höher liegen muss, da noch eindeutig zytotoxische Effekte mit darauffolgenden hohen LDH-Aktivitäten auftreten und eine deutliche MTT-Umsetzung gemessen werden kann.

Bei Betrachtung der Abbildung 5.9 kann nach einer Woche Glukoseentzug eine signifikant reduzierte LDH-Aktivität von 31,1% beobachtet werden, die im weiteren Verlauf weiter abnimmt. Dieses lassen auch die Auswertungen einzelner Versuche erkennen, die denselben Verlauf aufweisen (vgl. Abb. 5.10). Die Gesamtauswertung der MTT-Messung zeigt eine signifikant erniedrigte Zellviabilität nach einwöchigem Glukoseentzug, die im weiteren Verlauf signifikant abnimmt. In der Einzelbetrachtung in Abbildung 5.10 kann dies ebenfalls beobachtet werden, wobei Versuch 1 nach dreiwöchiger Exposition die deutlich niedrigste Zellviabilität von 2,0% aufweist. Alle Versuche zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle sowie innerhalb der Gruppe. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass infolge einer Langzeitexposition gegenüber einem Glukoseentzug die Zellviabilität stark reduziert ist und damit die LDH-Aktivität infolge der reduzierten Zellzahl und möglichen zytotoxischen Effekten abnimmt.

Daraus lässt sich schließen, dass bei Exposition gegenüber einer OGD und einem Glukoseentzug die LDH-Freisetzung und die Proliferationsfähigkeit der Zellen in Abhängigkeit zur Zeit abnehmen. Die Hypoxie-Gruppe hingegen weist im Vergleich eine höhere Zellviabilität auf, die nach drei Wochen noch eine Zunahme erkennen lässt. Demnach lassen sich auch stärkere zytotoxische Effekte messen, die nach zwei Wochen die höchste LDH-Aktivität bewirken.

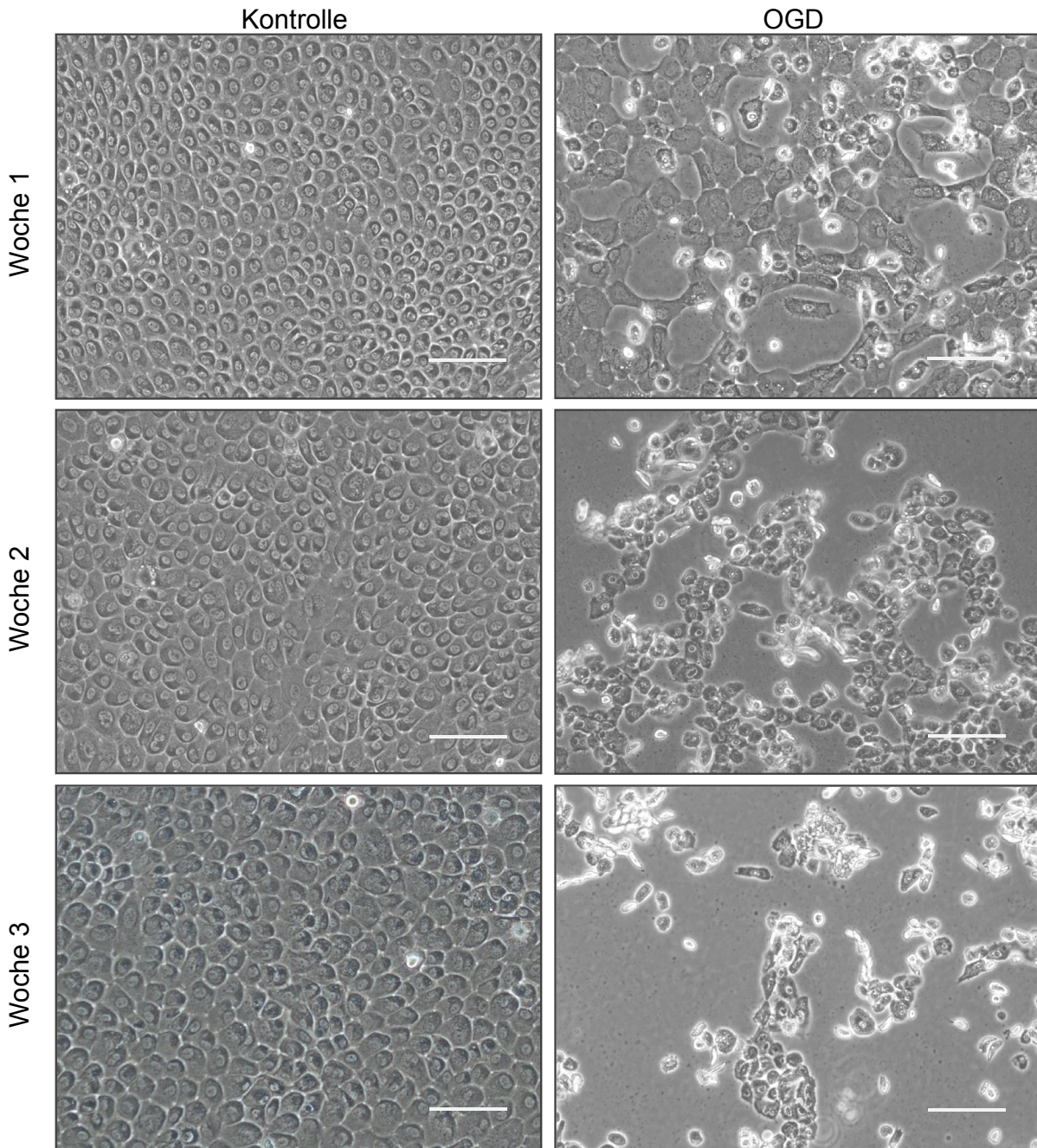
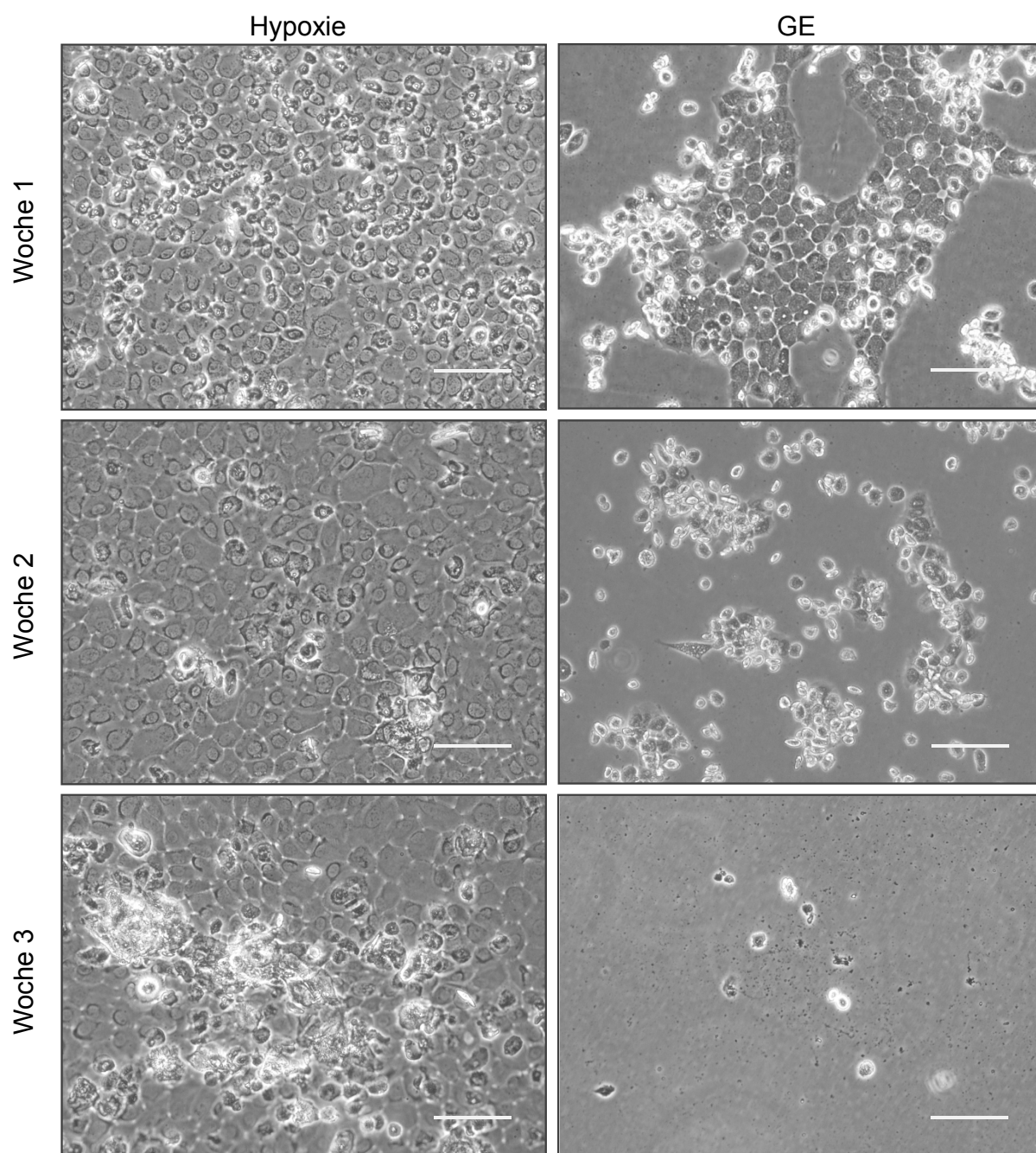


Abb. 5.11 Exposition der bovinen Keratinozyten gegenüber Kontrollbedingungen, oxygen glucose deprivation (OGD), Hypoxie (HYP) und Glukoseentzug (GE) für eine, zwei und drei Wochen. Kontrolle: Keratinozyten bilden konfluenten Monolayer und weisen kopfsteinpflasterartige Morphologie mit prominentem Nukleus auf. OGD: Nach einer Woche erscheinen die Keratinozyten abgeflacht und körnig, erweiterte Zellzwischenräume und tote Zellen mit Karyopyknose sichtbar, beginnende Zusammenhangstrennung des Zellrasens; nach drei Wochen nur noch wenige Zellen adhären, Zellform erscheint unregelmäßig und geschrumpft, dunkles Zytoplasma und Karyopyknose, tote Zellen; Hypoxie: Keratinozyten weisen prominente Nukleoli und umliegende Granula auf, Zellzwischenräume weiten sich, zunehmende Stratifizierung erkennbar. GE: Nach einer Woche erscheinen Keratinozyten körnig, kein Nukleus vorhanden, weite Zellzwischenräume und kein zusammenhängender Zellrasen mehr vorhanden, tote Zellen, nach drei Wochen keine vitalen Keratinozyten mehr vorhanden, vereinzelt tote Zellen und Zelldetritus; Messbalken entsprechen 100 µm.



Morphologische Veränderungen:

Bei Betrachtung der morphologischen Veränderungen infolge einer OGD, wie in Abbildung 5.11 dargestellt, sind nach einer Woche noch adhärente Keratinozyten im Zellverband zu erkennen. Weiterhin sind erweiterte Zellzwischenräume sowie eine Auflösung des Zellrasens zu sehen. Die Keratinozyten erscheinen stark abgeflacht und körnig. Weiterhin treten apoptotische Zellen mit charakteristischer Zellschrumpfung, Karyopyknose und dunklem Zytoplasma auf. Mit zunehmender Expositionsdauer nehmen die degenerativen Veränderungen zu, sodass nach drei Wochen noch wenige Keratinozyten adhärent sind, diese jedoch apoptotische Zellveränderungen aufweisen und durch den Verlust von Zellkontakten geprägt werden. Es lassen sich weiterhin Strukturen erkennen, die einer Stratifizierung ähneln.

Nach erfolgter Hypoxie sind die morphologischen Zellveränderungen ebenfalls deutlich sichtbar, jedoch weniger stark ausgeprägt. Auch nach dreiwöchiger Expositionsdauer ist ein konfluenter Monolayer mit hoher Zelldichte vorhanden. Die Keratinozyten erscheinen stark abgeflacht und körnig und weisen weite Zellzwischenräume auf. Zudem sind apoptotische Zellen sichtbar, die sich auf dem Monolayer befinden. Nach zwei Wochen ist eine beginnende Stratifizierung zu sehen, die nach drei Wochen deutlich ausgeprägt ist.

Nach einwöchigem Glukoseentzug ist eine deutliche Auflösung des Zellrasens zu erkennen. Die Keratinozyten erscheinen abgeflacht, stark körnig und sind durch den Verlust des Zellkerns gekennzeichnet. Außerdem sind apoptotische Zellen und Anzeichen für eine Stratifizierung zu sehen. Die Zellzwischenräume sind stark erweitert. Mit zunehmender Expositionsdauer schreiten die morphologischen Veränderungen fort, sodass nach drei Wochen weder vitale Keratinozyten noch zusammenhängende Zellkolonien zu sehen sind. Die massivsten Veränderungen in der Zellmorphologie verursacht demnach der Glukoseentzug.

5.3 Einfluss ischämischer, hypoxischer und glukosefreier Bedingungen auf das Differenzierungsverhalten der Keratinozyten

Die Expression terminaler Differenzierungsmarker Involukrin und Lorikrin wurde mittels Western Blot-Analyse gemessen, um eine mögliche Veränderung im Expressionsmuster infolge einer Ischämie feststellen zu können. Die Keratinozyten exprimieren Involukrin bei 69 kDa sowie Lorikrin bei 35 kDa. Als Ladekontrolle wurde für die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Untersuchung β -Aktin mit 42 kDa verwendet.

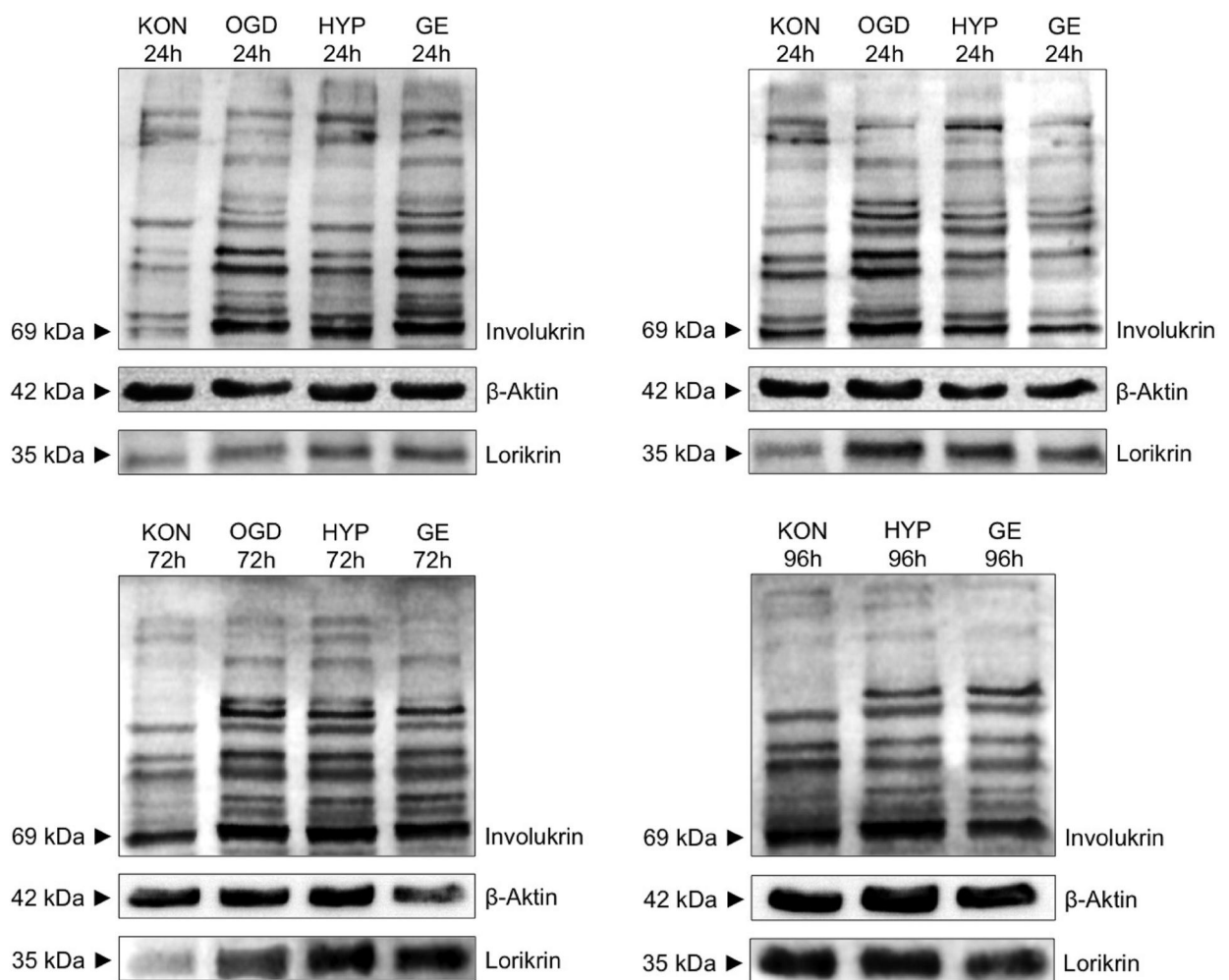


Abb. 5.12 Nachweis der Expression von Involukrin (69 kDa) und Lorikrin (35 kDa) mittels Western Blot-Analyse. Dargestellt sind repräsentative Western Blots ($n=3$), auf denen ein Anstieg der exprimierten Differenzierungsmarker infolge einer Exposition gegenüber der oxygen glucose deprivation (OGD), der Hypoxie (HYP) sowie einem Glukoseentzug (GE) über 24h, 48h, 72h und 96h im Vergleich zur Kontrolle (KON) zu sehen ist. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

5.3.1 Involukrin-Expression

In der Western Blot-Analyse konnten nach Inkubation mit dem Antikörper Involukrin in allen vier Versuchsgruppen und zu jedem Untersuchungszeitpunkt Proteinbanden in der zu erwartenden Höhe von 69 kDa detektiert werden, die in der Kontrollgruppe jedoch das schwächste Bande aufwiesen. Weiterhin konnten auf Höhe des Molekulargewichtes 90 kDa weitere Proteinbanden detektiert werden, die in der OGD-, Hypoxie- und Glukoseentzugs-Gruppe deutliche Doppelbanden aufwiesen (vgl. Abb. 5.12).

Für die Quantifizierung der Proteinbanden wurden die Banden auf Höhe von 69 kDa verwendet, sie sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Die einer OGD exponierten Kera-
tinozyten zeigen im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle eine erhöhte Involukrin-Expression, die während einer 72-stündigen Expositionsdauer auf 219,5% zunimmt. Eine Analyse nach 96 Stunden war aufgrund der stark reduzierten Zellzahl und verminderten Proteinexpression in der OGD-Gruppe nicht mehr möglich. Unter hypoxischen Bedingungen konnte ebenfalls eine erhöhte Involukrin-Expression nachgewiesen werden, die nach 48 Stunden mit 241,3% den höchsten Wert erreichte. Anschließend folgte ein Abfall der Involukrin-Expression auf 119,5% nach 96 Stunden.

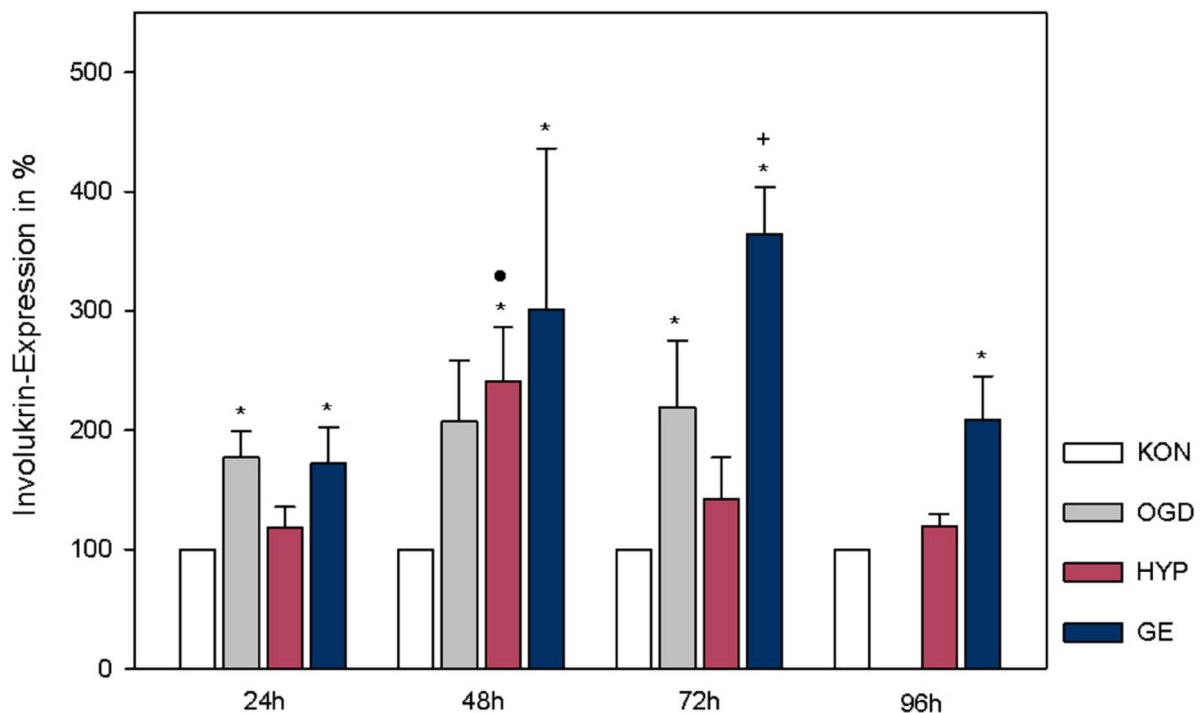


Abb. 5.13 Expression von Involukrin, einem Marker der terminalen Differenzierung, nach erfolgter oxygen glucose deprivation (OGD), Hypoxie (HYP) und Glukoseentzug (GE) nach 24h, 48h, 72h und 96h. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Das Diagramm zeigt die quantifizierten Proteinbanden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE aus drei voneinander unabhängigen Versuchen (n=3) in Relation zur Kontrolle (KON=100%). * $P < 0,05$ vs. KON, • $P < 0,05$ vs. HYP 24h, + $P < 0,05$ vs. GE 24h (einfaktorielle ANOVA).

Die Hypoxie-Gruppe weist damit über 96 Stunden eine niedrigere Involukrin-Expression im Vergleich zur OGD- und GE-Gruppe auf. Nach erfolgtem Glukoseentzug exprimierten die Keratinozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen ebenfalls vermehrt Involukrin und zeigten der OGD ähnelnd eine zeitabhängige Zunahme der Expression auf 364,7% innerhalb der 72-stündigen Exposition. Nach 96 Stunden konnte eine Abnahme der Involukrin-Expression auf 208,6% detektiert werden. Die GE-Gruppe zeigt damit die höchste Expression des Differenzierungsmarkers Involukrin. Somit konnte mittels Western Blot-Analyse eine veränderte Involukrin-Expression infolge ischämischer Konditionen nachgewiesen werden, die sich in einer vermehrten Expression zeigte.

5.3.2 Lorikrin-Expression

Nach Inkubation mit dem Antikörper gegen Lorikrin konnten in der zu erwartenden Höhe von 35 kDa Proteinbanden detektiert werden, die jedoch eine geringere Intensität als die Involukrin-Banden aufwiesen (vgl. Abb. 5.12). Die Banden der OGD-, Hypoxie- und GE-Gruppe zeigten hier im Vergleich zu den Banden der Kontrollgruppe eine deutlichere Markierung. Auffällig war das zusätzliche Auftreten von deutlichen Proteinbanden, die sich auf der Höhe der mit Involukrin markierten Banden bei 69 kDa befanden.

Wie in Abbildung 5.14 zu sehen, kommt es infolge ischämischer Konditionen in allen drei Gruppen im Vergleich zur Kontrolle zu einer deutlichen Zunahme der Lorikrin-Expression. Die OGD-Gruppe zeigte nach einer 24-stündigen Exposition eine Lorikrin-Expression von 173,4%, die nach einer Erniedrigung nach 72 Stunden signifikant auf 240,0% anstieg. Auch hier konnte nach 96 Stunden aufgrund der zu geringen Zellzahl und verminderten Proteinexpression keine Untersuchung durchgeführt werden. Infolge einer Hypoxie zeigten die Keratinozyten ebenfalls eine erhöhte Lorikrin-Expression, die nach 24 Stunden 172,1% ($p < 0,05$) betrug und innerhalb einer 72-stündigen Exposition einen nahezu konstanten Verlauf aufwies. Es folgte nach 96 Stunden eine signifikante Verminderung der Expression auf 71,2%.

Infolge eines Glukoseentzugs zeigten die Keratinozyten die höchste Lorikrin-Expression im Vergleich zur Kontrolle, OGD und Hypoxie. Nach 24 Stunden betrug die Expression 232,3% und stieg weiter auf 322,9% nach 72 Stunden an. Dem folgte nach 96 Stunden ein Abfall der Lorikrin-Expression auf 106,3%.

Hier konnten ebenfalls ischämiebedingte Veränderungen der Lorikrin-Expression nachgewiesen werden. Infolge eines Glukoseentzugs konnte die stärkste Lorikrin-Expression nachgewiesen werden, gefolgt von der OGD und schließlich der Hypoxie.

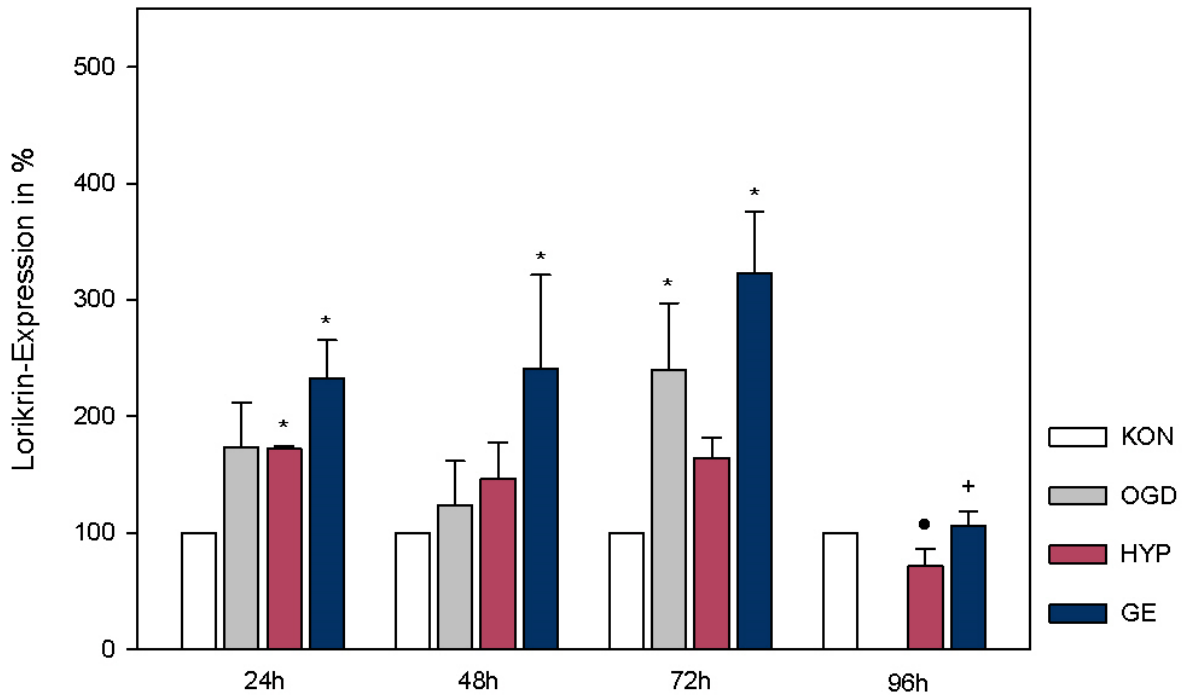


Abb. 5.14 Expression von Lorikrin, einem Marker der terminalen Differenzierung, nach erfolgter oxygen glucose deprivation (OGD), Hypoxie (HYP) und Glukoseentzug (GE) nach 24h, 48h, 72h und 96h. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Das Diagramm zeigt die quantifizierten Proteinbanden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SE aus drei voneinander unabhängigen Versuchen ($n=3$) in Relation zur Kontrolle (KON=100%). * $P<0,05$ vs. KON, • $P<0,05$ vs. HYP 24h, + $P<0,05$ vs. GE 24h (einfaktorielle ANOVA).

6 Diskussion

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines In-vitro-Ischämiemodells für Keratinozyten aus der Rinderklaue, um die initialen pathophysiologischen Prozesse infolge einer dermalen Ischämie während der Pathogenese der Klauenrehe untersuchen zu können. Mithilfe eines solchen In-vitro-Modells können die epidermalen Reaktionen auf pathophysiologische Veränderungen der Dermis untersucht werden.

Die Diskussion der Ergebnisse wird im vorliegenden Kapitel in vier Abschnitte unterteilt. Zu Beginn wird die Methodik des etablierten In-vitro-Ischämiemodells und der sich anschließenden Untersuchungen zur Zellviabilität und -differenzierung erörtert. Im darauf folgenden Abschnitt werden die zellulären Mechanismen der Keratinozyten infolge einer Hypoxie, eines Glukoseentzugs sowie einer OGD diskutiert und in den Kontext einer vorherrschenden physiologischen Hypoxie und einer pathologischen Ischämie in vivo gesetzt. Im dritten Teil wird die Zelldifferenzierung infolge ischämischer Bedingungen unter Berücksichtigung physiologischer Vorgänge in der Epidermis sowie pathophysiologischer Vorgänge diskutiert. Der abschließende Abschnitt behandelt weiterführende Untersuchungsmöglichkeiten und das Anwendungspotenzial des verwendeten In-vitro-Ischämiemodells in der Forschung zur Pathogenese der Klauenrehe.

6.1 Beurteilung der Methodik des etablierten In-vitro-Ischämiemodells

Im Folgenden werden das In-vitro-Ischämiemodell, die Versuchsbedingungen und -dauer sowie die Zellvitalitäts-Assays im Einzelnen diskutiert.

6.1.1 Das In-vitro-Ischämiemodell

Für die Etablierung des In-vitro-Ischämiemodells wurde das in der Schlaganfallforschung etablierte oxygen glucose deprivation (OGD)-Modell gewählt (MELONI et al. 2011), welches für die vorliegend dokumentierte Untersuchung mit epidermalen Keratinozyten modifiziert wurde. Damit wurde erstmals der simultane Sauerstoff- und Glukoseentzug an bovinen Keratinozyten der Klaue untersucht.

OGD-Modelle boten sich für die Nutzung in der vorliegenden Studie an, da sie aufgrund ihrer einfachen Handhabung leicht zu etablieren sind und durch Nutzung von

96 Well-Mikrotiterplatten die Untersuchung eines großen Stichprobenumfangs und die Verwendung lediglich kleiner Zellzahlen erlauben (MELONI et al. 2011). So wurden pro Bedingung und Expositionszeitpunkt zehn technische Replikate mit jeweils einer Zelldichte von 30.000 Zellen/Well gewählt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten und mögliche Messfehler ausschließen zu können.

Ein weiterer Vorteil des OGD-Modells ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Untersuchung verschiedener Kultivierungsbedingungen auf einer Mikrotiterplatte, sodass in der vorliegenden Studie zur OGD eine parallele Untersuchung zellulärer Reaktionsmechanismen nach erfolgter Hypoxie und erfolgtem Glukoseentzug durchgeführt werden konnte. Folglich konnte die Anzahl verwendeter Zellkulturplatten reduziert und damit die sogenannten Plattenartefakte so gering wie möglich gehalten werden.

In der Schlaganfallforschung werden für die OGD-Modelle vorwiegend Monolayerkulturen, die auf lediglich einer Zellart basieren, mit sehr hohem Reinheitsgrad verwendet. Hierdurch können einerseits die Komplexität der Zellpopulation reduziert und andererseits vaskuläre, hormonelle und immunologische Einflüsse ausgeschlossen werden (MELONI et al. 2001). Damit wird die Erforschung funktioneller Grundlagen und Zellmechanismen ermöglicht (LEMPER et al. 2014). So wurden für die vorliegende Forschungsarbeit bovine Keratinozyten aus der Klaue eigens für die Versuche isoliert und kultiviert. Mithilfe des verwendeten Keratinozytenmediums konnte der Fibroblastenanteil so gering gehalten werden, dass die Keratinozyten ab der vierten bis fünften Zellpassage einen sehr hohen Reinheitsgrad aufwiesen, wie die Ergebnisse der morphologischen und immunzytochemischen Untersuchungen belegten (vgl. Kap. 5.1.1 und 5.1.2). Die hohe Reinheit ermöglichte die Verwendung im OGD-Modell. Dabei sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass auf Keratinozyten basierende Monolayerkulturen aufgrund der fehlenden Wechselwirkung mit den dermalen Zellen sowie des ausbleibenden Signal- und Wachstumsfaktorenaustauschs nicht repräsentativ für die Epidermis in vivo sind. Dies kann ferner zu einem veränderten Differenzierungsverhalten führen (LEMPER et al. 2014).

6.1.2 Wahl der Versuchsbedingungen und -dauer

Als Kontrolle wurden in der vorliegend dokumentierten Untersuchung die Keratinozyten unter Standardbedingungen und somit einer atmosphärischen Sauerstoffkonzentration von 21% kultiviert, eine in Studien mit epidermalen Zellen üblicherweise verwendete Kultivierungsbedingung (NGO et al. 2007, PORTUGAL-COHEN und KOHEN 2009, STRASESKI et al. 2009). Der epidermale Sauerstoffstatus hingegen wird in der Literatur kontrovers diskutiert, da aufgrund der Entfernung zum mikrovaskulären Gefäßsystem der Dermis eine im Vergleich zur Atmosphäre hypoxische

Sauerstoffkonzentration vorherrscht (BEDOGNI und POWELL 2009, BEDOGNI et al. 2005, EVANS et al. 2006). So werden hypoxische Sauerstoffkonzentrationen der Epidermis von 10% in den basalen Zelllagen bis zu 0,5% in den suprabasalen Zellschichten angegeben (BEDOGNI und POWELL 2009). Folglich werden epidermale Zellkulturen einer hyperoxischen Sauerstoffkonzentration ausgesetzt, die laut BEDOGNI und POWELL (2009) zu oxidativem Stress und einer DNA-Schädigung führt. Physiologische Kultivierungsbedingungen, die den realen Sauerstoffgehalt in vivo berücksichtigen, können die oxidative Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) reduzieren. Des Weiteren konnte in experimentellen In-vitro-Studien ein verbessertes Wachstum epidermaler Zellen unter leicht hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen zwischen 1% und 5% festgestellt werden (BEDOGNI und POWELL 2009). Dagegen wiesen PENTLAND und MARCELO (1983) bei einer 5%igen Hypoxie eine verminderte Zellproliferation der Keratinozyten von lediglich 23% im Vergleich zur Kontrolle nach. Aufgrund dieser variierenden Aussagen und den fehlenden Angaben zu einer eindeutigen Sauerstoffkonzentration im Stratum basale, die als Kontrollbedingung verwendet werden könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit die Pilotstudie 2 bei einer Sauerstoffkonzentration von 5% durchgeführt. Diese hatte zum Ziel, die Zytotoxizität und Zellviabilität einer 5%igen Sauerstoffkonzentration im Vergleich zu den atmosphärischen Standardbedingungen zu untersuchen und diese miteinander zu vergleichen. Im Vergleich zu den Kontrollbedingungen konnte bei einer 5%igen Hypoxie über 72 Stunden eine leicht erhöhte LDH-Aktivität gemessen werden. Der MTT-Test hingegen zeigte lediglich eine geringfügig erhöhte Zellviabilität, die sich nach 48 und 72 Stunden nicht mehr signifikant von der Kontrolle unterschied. Die geringgradig erhöhten LDH-Aktivitäten stellen nicht unmittelbar das Resultat einer gesteigerten zytotoxischen Schädigung dar, da die Expression von LDH nachweislich durch Hypoxie hochreguliert wird (LUNT und VANDER HEIDEN 2011). Demnach wird hier bei einem normalen Zelluntergang mehr LDH freigesetzt als durch die Kontrollzellen. Damit weisen die Ergebnisse einer hypoxischen Sauerstoffkonzentration von 5% im Vergleich zu den Kontrollzellen keine signifikanten Unterschiede auf. Daraus lässt sich folgern, dass bei der Verwendung einer Sauerstoffkonzentration von 21%, wie sie in der Zellkultur üblicherweise verwendet wird, die Einflüsse auf die statistische Auswertung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den nachfolgenden Untersuchungen vernachlässigbar sind. Da weiterhin keine eindeutigen und auf dieses System übertragbaren Werte der basalen Sauerstoffkonzentration vorhanden sind, diente in der Hauptstudie der Untersuchung als Kontrollbedingung die 21%ige Sauerstoffkonzentration.

OGD-Modelle, die auf neuronalen Zellen oder Astrozyten basieren, sehen vorwiegend Kurzzeituntersuchungen mit Expositionszeiten von 60 Minuten vor (MELONI et

al. 2011). Dahingegen werden auf Keratinozyten basierende epidermale Zellkulturen hypoxischen Bedingungen über längere Expositionszeiträume zwischen 24 und 192 Stunden ausgesetzt (GILL et al. 2010, STRASESKI et al. 2009), da erst nach einer 24-stündigen Hypoxie messbare Zell- und Gewebeveränderungen auftreten (STRASESKI et al. 2009). GILL et al. (2010) wiesen infolge einer Hypoxie über 192 Stunden mit Zunahme der Expositionsdauer eine Abnahme der basalen Zellproliferation sowie Veränderungen der Zellmorphologie nach. Ferner wiesen sie auf längere Untersuchungszeiträume hin, die für die Untersuchungen der Zellviabilität und für die Etablierung eines chronischen Ischämiemodells notwendig seien. Die langen Expositionszeiten sind vermutlich auf die Adaptation des Zellmetabolismus der Keratinozyten an die physiologisch vorhandene leichte Hypoxie der Epidermis zurückzuführen (BEDOGNI und POWELL 2009). Aus diesem Grund und basierend auf den Ergebnissen der Pilotstudie 1 wurde die Hauptstudie in eine Kurzzeitanalyse der Keratinozyten über 96 Stunden sowie eine Langzeitanalyse über drei Wochen unterteilt. Dabei entspricht die Kurzzeitanalyse der Untersuchung einer akuten Ischämie. Die Ergebnisse verdeutlichen die initialen pathologischen Veränderungen nach Eintritt einer Ischämie. Da die häufig auftretenden Reheformen wie die CHD eine sich langsam entwickelnde und länger andauernde Pathogenese in Folge anhaltender ischämischer Bedingungen durch eine andauernde Störung der dermalen Mikrozirkulation aufweisen (HOBLET und WEISS 2001, MÜLLING und LISCHER 2002), ermöglicht die Langzeitanalyse die Untersuchung einer chronischen Ischämie.

Des Weiteren sehen In-vitro-Modelle, die ischämische oder hypoxische Bedingungen untersuchen, nach erfolgter Exposition gegenüber den Versuchsbedingungen eine Reoxygenierung vor, also eine Inkubation unter normoxischen Bedingungen mit Standardmedium. In der vorliegend dokumentierten Studie betrug diese 24 Stunden, da erst 24 Stunden nach erfolgter Reoxygenierung die stärksten Zell- und Stoffwechselveränderungen zu messen sind. Da diese Zellveränderungen als reversibel beschrieben werden, würden längere Reoxygenierungszeiten eine Zell- und Geweberegeneration nach sich ziehen (STRASESKI et al. 2009). Darüber hinaus wurde für die Reoxygenierung ein Medium ohne Supplementierung mit fetalem Kälberserum (FKS) gewählt, da FKS nachweislich einen hohen Laktatgehalt aufweist und dies zu einer Beeinflussung der Ergebnisse des LDH-Assays führt (YANG et al. 2014).

6.1.3 Vitalitätsuntersuchungen

Für die Vitalitätsuntersuchungen im Anschluss an die erfolgten Versuche dienten zum einen der LDH-Zytotoxizitätstest und zum anderen der MTT-Test. Sie zählen zu den am häufigsten verwendeten Methoden zur Quantifizierung der Zellviabilität (ABE

und MATSUKI 2000) und sind für die Verwendung von 96 Well-Mikrotiterplatten optimiert worden (WEYERMANN et al. 2005). Die Nutzung dieser Assays erlaubt eine schnelle und simultane Untersuchung eines großen Stichprobenumfangs, eine kurzwährende Versuchsdauer und die kolorimetrische Messmöglichkeit per ELISA-Mikroplattenreader (HAYON et al. 2003, WEYERMANN et al. 2005). Insbesondere der LDH-Zytotoxizitätstest findet in der Toxikologie breite Verwendung und stellt in Kombination mit dem MTT-Assay Informationen über zytotoxische Effekte bereit (ISSA et al. 2004).

Jedoch ist anhand dieser Vitalitätsassays keine Beurteilung der Form des Zelltods möglich. Hier kann mithilfe der Zellmorphologie lediglich eine Einschätzung erfolgen. Die Apoptose stellt einen aktiven und energieabhängigen Prozess dar, der ATP für die Aktivierung der molekularen Kaskade benötigt. Wird das ATP bis auf 35% verbraucht, so gewinnt die Nekrose als Zelltodmechanismus an Bedeutung (CAO et al. 2010). Dies legt die Vermutung nahe, dass gerade nach erfolgter OGD und GE die Zellen zu Beginn einer Apoptose unterliegen und im späteren Verlauf bei ATP-Mangel den nekrotischen Zelltod eingehen.

6.1.3.1 LDH-Assay

Der LDH-Zytotoxizitätstest misst die Freisetzung der intrazellulären LDH, eines stabilen zytoplasmatischen Enzyms, infolge einer Schädigung der Zellmembran (WEYERMANN et al. 2005, ISSA et al. 2004, ABE und MATSUKI 2000). Er macht sich die durch LDH katalysierte, reversible Transformation von Pyruvat zu Laktat unter anaeroben Bedingungen zu Nutze, verbunden mit der Oxidation von NADH zu NAD^+ (MIAO et al. 2013). LDH kommt lediglich in lebensfähigen Zellen vor (ISSA et al. 2004) und spielt in der Regulation der Glykolyse eine Schlüsselrolle, da sie hier den letzten Schritt katalysiert (MIAO et al. 2013). Die jeweilige Zell- und Gewebeart weist unter gegebenen Zellbedingungen eine für sie bestimmte und auf ihrer Funktion basierende LDH-Aktivität auf (MIAO et al. 2013, ISSA et al. 2004). Die LDH-Level der Zellen werden durch verschiedene Kultivierungsparameter, wie die Sauerstoffkonzentration, die Kohlenstoffquelle und der pH-Wert, beeinflusst (ISSA et al. 2004) und können infolge von Hypoxie, Gewebeverletzung und Nekrose ansteigen (MIAO et al. 2013). Zum einen exprimieren schnell proliferierende Zellen infolge der gesteigerten Glykolyse große Mengen an LDH (LUNT und VANDER HEIDEN 2011). Andererseits wird infolge einer Hypoxie und damit der Aktivierung von HIF-1 die LDH-Expression hochreguliert (LUNT und VANDER HEIDEN 2011, MIAO et al. 2013, PAPANDREOU et al. 2006). Damit trotz anaerober Bedingungen weiterhin die Energieproduktion ermöglicht wird (PAPANDREOU et al. 2006), folgt eine gesteigerte

Glykolyse und Glukoseaufnahme für die Umwandlung zu Laktat (MIAO et al. 2013). Die LDH-Hochregulierung steigert demnach die Effizienz der anaeroben Glykolyse und reduziert damit die Sauerstoffabhängigkeit des zellulären Metabolismus (MIAO et al. 2013). Da in der hier beschriebenen Analyse unter anderem die Hypoxie eine Untersuchungsbedingung darstellt, sollten hier die LDH-Aktivitätswerte unter besonderer Berücksichtigung der LDH-Hochregulierung betrachtet und interpretiert werden. Weiterhin muss bei der Durchführung des LDH-Zytotoxizitätstests beachtet werden, dass durch eine Supplementierung des Nährmediums mit FKS die Ergebnisse beeinträchtigt werden können. FKS weist nachweislich einen hohen Laktatgehalt auf, was zur Beeinflussung der Ergebnisse des LDH-Assays führt (YANG et al. 2014). Daher wurde für das vorliegende Ischämiemodell ein Reoxygenierungsmedium ohne FKS-Supplementierung gewählt, um diesen Einflussfaktor zu regulieren.

6.1.3.2 MTT-Assay

Zur Messung der metabolischen Stoffwechselaktivität der Keratinozyten und somit der Zellviabilität nach erfolgter Exposition gegenüber den Versuchsbedingungen wurde der MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Assay, ein Tetrazoliumreduktions-Assay, verwendet.

Das Prinzip des Assays basiert auf der Aufnahme des MTTs in die Zelle über Endozytose. In der Zelle findet die MTT-Reduktion durch Übertragung von Elektronen mittels der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase (Enzymkomplex II der Atmungskette) sowie vermutlich weiteren Zellorganellen statt, die NADH oder ähnlich reduktive Moleküle aufweisen (RISS et al. 2004, TAKAHASHI et al. 2002). Das reduzierte und blau-farbene Formazan wird anschließend durch Exozytose zur Zelloberfläche transportiert und in Form nadelartiger Formazankristalle abgelagert (TAKAHASHI et al. 2002). Die MTT-Reduktion kann demnach als Indikator für die metabolische Aktivität viabler Zellen angesehen werden (HAYON et al. 2003, RISS et al. 2004, TAKAHASHI et al. 2002), da diese mit Eintreten des Zelltods ihre Fähigkeit der MTT-Umwandlung verlieren (RISS et al. 2004). Weiterhin reflektiert die MTT-Reduktion die gesteigerte mitochondriale Oxidationsaktivität in Zusammenhang mit der Zunahme des Glukoseverbrauchs (TAKAHASHI et al. 2002).

Die in der hier beschriebenen Studie im MTT-Test gemessenen Ergebnisse korrelierten zwar mit den Ergebnissen des LDH-Zytotoxizitätstests, jedoch waren innerhalb der Untersuchungsdauern deutliche Schwankungen zu erkennen. Diese könnten zum einen auf Variationen in der Stoffwechselaktivität infolge des Erreichens der Konfluenz in vitro zurückzuführen sein, da infolge der Kontaktinhibition das Zellwachstum und der Zellmetabolismus heruntergefahren werden. Dies hat eine Ab-

nahme der reduzierten MTT-Menge pro Zelle und der Linearität zwischen Absorbanz und Zellzahl zur Folge, sodass der MTT-Assay als nicht spezifisch für die Zellproliferation erachtet wird (RISS et al. 2004). Eine verminderte Stoffwechselaktivität infolge einer Kontaktinhibition kann trotz Verwendung derselben Zelldichte und Zellpassage sowie derselben Kultivierungsdauer zwischen dem Ausplattieren der Keratinozyten und dem Versuchsbeginn nicht ausgeschlossen werden. Unterschiedliche Proliferationsaktivitäten der Keratinozyten nach dem Ausplattieren sowie zwischen und innerhalb der Versuche können zu variierenden Zelldichten im Versuchsverlauf und damit zu veränderten Stoffwechselaktivitäten führen. Diese können außerdem durch eine unterschiedliche Anzahl an Mitochondrien innerhalb der Keratinozyten sowie durch Plattenartefakte infolge der Verwendung getrennter Zellkulturplatten verursacht werden.

Die Validität der Ergebnisse des MTT-Assays kann durch verschiedene Effekte, wie beispielsweise einen Glukosemangel oder eine verminderte NADH- oder NADPH-Verfügbarkeit beeinflusst werden, da dies eine Abnahme des Zellmetabolismus und damit der MTT-Reduktion zur Folge hat (HAYON et al. 2003, LIU et al. 1997, RISS et al. 2004). Für die Endozytose und die anschließende Reduktion des MTTs muss die Zelle über ATP und NADH verfügen, die durch die Glykolyse bereitgestellt werden (LIU et al. 1997). In der vorliegend dokumentierten Studie lag der Fokus auf den zellulären Auswirkungen einer OGD sowie eines ausschließlichen Glukosemangels, welche beide infolge einer verminderten Energiebereitstellung zu einer Beeinflussung der Ergebnisse des MTT-Assays führen können.

Zudem belegten insbesondere die Ergebnisse des Glukoseentzugs in der Langzeituntersuchung noch eine deutliche Zellviabilität, während die Zellmorphologie massive Veränderungen, wie eine beginnende Stratifizierung und eine Auflösung des Zellverbands, zeigte. Ursächlich hierfür könnte die einsetzende Apoptose der Keratinozyten sein, da Zellen in der frühen Phase der Apoptose noch über funktionsfähige und metabolisch aktive Mitochondrien verfügen. Damit ist weiterhin eine MTT-Reduktion möglich, was die Validität der Ergebnisse beeinflusst (HAYON et al. 2003).

Infolge der Abhängigkeit von der metabolischen Zellaktivität ist die Aussagekraft des MTT-Assays zu hinterfragen. Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigen zwar die Auswirkungen der verschiedenen Versuchsbedingungen auf den Zellstoffwechsel, jedoch sollten die Ergebnisse des MTT-Tests nur adäquat reflektiert sowie lediglich in Kombination mit den Ergebnissen des LDH-Zytotoxizitätstests interpretiert werden, der sich durch eine hohe Zuverlässigkeit auszeichnet.

6.2 Beurteilung der Effekte hypoxischer, hypoglykämischer und ischämischer Bedingungen auf die Keratinozyten

Im Folgenden werden die Wirkungen einer Hypoxie, eines Glukoseentzugs und die eines gleichzeitigen Sauerstoff- und Glukoseentzugs (OGD) auf die Zellviabilität und den Zellmetabolismus der Keratinozyten diskutiert.

6.2.1 Effekt eines Sauerstoffmangels auf die Zellviabilität der Keratinozyten

Infolge hypoxischer Bedingungen erfolgte eine zeitabhängige Zunahme der zytotoxischen Schädigung, gemessen an der LDH-Aktivität, die in der Kurzzeitanalyse nach 96 Stunden die höchsten Werte zeigte. In der Langzeitanalyse erfolgte ebenfalls eine zeitabhängige Zunahme der LDH-Aktivität, die nach zwei Wochen ihr Maximum erreichte. Die LDH-Aktivität war im Vergleich zur OGD und zum GE hier am höchsten. Die Zytotoxizität wurde begleitet durch eine signifikant erniedrigte Zellviabilität im MTT-Reduktions-Assay, die ebenfalls eine Abhängigkeit von der Expositionszeit zeigte und schließlich nach dreiwöchiger Exposition in der Langzeitanalyse signifikant erniedrigt war. Die Zellviabilität zeigte hier ebenfalls die höchsten Werte.

Eine Abnahme der Zellviabilität kultivierter Keratinozyten unter hypoxischen Bedingungen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer wird in verschiedenen Studien beschrieben und verdeutlicht die hohe Toleranz der Keratinozyten gegenüber verringerten Sauerstoffkonzentrationen. So konnten WEIR et al. (2011) eine verminderte Zellviabilität primärer Keratinozyten infolge einer 20-stündigen Hypoxie nachweisen. STRASESKI et al. (2009) beobachteten nach einer Hypoxie von 48 Stunden in organotypischen Epidermismodellen eine verminderte Zellproliferation basaler Keratinozyten mit gleichzeitig erhöhten Glykogenspeichern. GILL et al. (2010) stellten im Verlauf einer Expositionsdauer von 192 Stunden gegenüber hypoxischen Bedingungen eine progressive Abnahme proliferierender Keratinozyten im Stratum basale fest. Unter Einbeziehung der morphologischen Veränderungen der Keratinozyten – ein weiterhin dichter Zellrasen mit hoher Zelldichte, abgeflachte Keratinozyten mit granulareichem Zytoplasma, erweiterte Zellzwischenräume sowie eine zeitlich zunehmende Stratifizierung – konnte in den eigenen Untersuchungen eine hohe Überlebensfähigkeit der Keratinozyten unter langandauernden hypoxischen Bedingungen gezeigt werden. Vergleichbare Veränderungen der Zellmorphologie konnten GILL et al. (2010) infolge hypoxischer Bedingungen feststellen. Diese umfassten Zelldegenerationen, abnehmende Proliferationsaktivitäten in den Basalzelllagen sowie Zusammenhangstrennungen der dermo-epidermalen Verbindung (GILL et al. 2010). Weiterhin wiesen sie unter normoxischen Bedingungen ebenfalls morphologische Ver-

änderungen nach: kleine und dicht gepackte Keratinozyten im Stratum basale, die mit fortschreitender Migration in die oberen Zellschichten an Größe zunehmen und abflachen, sowie größer werdende Zellzwischenräume (GILL et al. 2010). Dies verdeutlicht die Adaptation epidermaler Keratinozyten an niedrige Sauerstoffkonzentrationen (STRASESKI et al. 2009), die überdies unter physiologischen Bedingungen mit zunehmender Entfernung zum mikrovaskulären System in der Epidermis vorherrschen (BEDOGNI et al. 2005, HIRSCHBERG et al. 2001), wie unter 6.1.2 näher erläutert. Damit einher geht die Zelldifferenzierung, an deren Ende der ausdifferenzierte und nicht mehr lebensfähige Korneozyt steht. Die erst nach längeren Expositionszeiten veränderte Zellviabilität mit den vergleichsweise höchsten LDH-Aktivitätswerten sowie die Veränderung der Zellmorphologie bei vollständigem Zellverband weisen auf eine Adaptation der Keratinozyten gegenüber hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen hin. Diese geht vermutlich mit einem an Hypoxie angepassten Zellmetabolismus sowie einer vorangeschrittenen Zelldifferenzierung einher. Der klassische Adaptationsmechanismus der Zellen an Hypoxie wird durch den Wechsel vom oxidativen zum glykolytischen Metabolismus gekennzeichnet, um einem energetischen Mangel an ATP und Überschuss an Oxidationsmitteln vorbeugen zu können (YANG et al. 2014). Energie in Form von ATP ist für die Zelle von großer Bedeutung, da sie in die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Zellprozesse und biosynthetischer Reaktionen wie Zellwachstum, -differenzierung, -tod und -überleben involviert ist (BONORA et al. 2012, LUNT und VANDER HEIDEN 2011). Ein Verlust an ATP resultiert unweigerlich in Zellnekrose und -apoptose (LUNT und VANDER HEIDEN 2011). Glukose wird über den Embden-Meyerhof-Weg glykolytisch zu Pyruvat abgebaut (YANG et al. 2014), welches unter anaeroben Bedingungen nicht vollständig und effizient oxidiert werden kann. Somit findet schließlich die fermentative Umwandlung von Pyruvat zu Laktat statt (BONORA et al. 2012). Dieser Kompensationsmechanismus ist weniger effizient als die oxidative Phosphorylierung und stellt lediglich zwei Moleküle ATP pro Molekül Glukose bereit (BONORA et al. 2012, YANG et al. 2014). Dennoch kann über diesen Weg mehr ATP gewonnen werden, da ATP per Glykolyse schneller bereitgestellt wird (LUNT und VANDER HEIDEN 2011). Folglich steigt die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat, welches schließlich aus den hypoxischen Zellen über einen Monocarboxylat-Transporter in den extrazellulären Raum transportiert wird (YANG et al. 2014). Auch unter normoxischen Bedingungen stellt die anaerobe Glykolyse aufgrund der hohen metabolischen Rate der Epidermis die Hauptform des Zellmetabolismus dar (STRASESKI et al. 2009). Die proliferierenden Keratinozyten der epidermalen Basalzellschicht metabolisieren damit trotz der Anwesenheit von Sauerstoff mittels hochregulierter Glykolyse Glukose zu Laktat (LUNT und VANDER HEIDEN 2011, RONQUIST et al. 2003), um in kürzerer

Zeit große Mengen an Glukose verbrauchen und die Level an glykolytischen Zwischenprodukten für die Biosynthese aufrechterhalten zu können (LUNT und VANDER HEIDEN 2011). Damit wird deutlich, dass epidermale Keratinozyten einen ausgeprägten anaeroben Stoffwechsel besitzen, der die Zellproliferation unterstützt, aber auch während ihrer Migration in die oberen und damit hypoxischen Zellschichten den Glukosemetabolismus und lebenswichtige Zellfunktionen aufrecht erhält.

Die Anpassung des Glukosemetabolismus an eine Hypoxie ist jedoch komplexer. So reagieren epidermale Zellen auf eine Hypoxie mit der Aktivierung des hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). HIF-1 aktiviert eine Vielzahl an sauerstoffabhängigen Genen, die in verschiedenen Zellfunktionen wie Zellüberleben, Apoptose, Glukosemetabolismus und Angiogenese involviert sind (BEDOGNI und POWELL 2009). So bewirkt HIF-1 unter hypoxischen Bedingungen eine Hochregulierung der Glukosetransporter GLUT-1 und -3, der glykolytischen Enzyme wie LDH sowie der Expression des vascular endothelial growth factor (VEGF) (LUNT und VANDER HEIDEN 2011, MIAO et al. 2013). Dies geht mit einer gesteigerten Glukoseaufnahme und Effizienz der anaeroben Glykolyse mit gleichzeitig erhöhter Laktatbildung einher (MIAO et al. 2013, PELLETIER et al. 2012, YANG et al. 2014) und bewirkt eine Reduktion der Sauerstoffabhängigkeit des zellulären Metabolismus (MIAO et al. 2013). Die auch nach drei Wochen noch vorhandene und im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen deutlich höhere Zellviabilität sowie die Zellmorphologie lassen sich infolge dieses Kompensationsmechanismus erklären. Die hohen LDH-Werte zeigen den zytotoxischen Effekt der Hypoxie auf die Keratinozyten, jedoch können die deutlich höheren LDH-Werte dieser Gruppe auf die durch HIF-1 vermittelte LDH-Hochregulierung zurückzuführen sein.

Eine weitere Form der Adaptation an hypoxische Bedingungen und die damit einhergehende hochregulierte anaerobe Glykolyse ist die Glukosespeicherung in Form von Glykogen (STRASESKI et al. 2009). Die epidermalen Zellen nehmen im Verlauf der Zelldifferenzierung an Entfernung zum dermalen Gefäßsystem zu, wodurch die Glykogenspeicher entscheidend für die Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus und damit das Überleben der Zellen werden (STRASESKI et al. 2009). Glykogen stellt als Energiereserve einen metabolischen Überlebensweg dar, da es schnell für die Deckung des Energieverbrauchs mobilisiert werden kann (PELLETIER et al. 2012). So sind unter normoxischen Konditionen Glykogenspeicher in den Keratinozyten des Stratum spinosum und granulosum zu finden (STRASESKI et al. 2009), die in den proliferierenden Keratinozyten der Basalzellschicht infolge ihrer hohen metabolischen Rate nicht vorhanden sind (STRASESKI et al. 2009). Dahingegen sind infolge hypoxischer Sauerstoffkonzentrationen erhöhte Glykogenlevel bereits in den Keratinozyten der Basalzellschicht nachweisbar (PELLETIER et al. 2012, STRASESKI et al.

2009). Diese Zunahme der Glykogenbildung infolge einer Hypoxie wird durch HIF-1 induziert (PELLETIER et al. 2012). Diese Adaptation ermöglicht es den Keratinozyten demnach, während einer Hypoxie den gesteigerten Glukosebedarf infolge der hochregulierten anaeroben Glykolyse decken zu können, um den Glukosemetabolismus und die Zellfunktionen sowie die Zellviabilität aufrechtzuerhalten.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der eigenen Ergebnisse und in Übereinstimmung mit der Literatur feststellen, dass bovine Keratinozyten über verschiedene Zellmechanismen verfügen, um ihren Glukosemetabolismus und ihre Zellfunktionen unter physiologischen Bedingungen an das hypoxische Umgebungsmilieu der Epidermis anpassen zu können. Dies wird begleitet durch eine fortschreitende Zelldifferenzierung, auf die die morphologischen Veränderungen hinweisen und die im Kapitel 6.3 diskutiert wird. Während die Epidermis eine moderate Hypoxie aufweist, bewirken Störungen der dermalen Mikrovaskulatur eine Verschlechterung des hypoxischen Milieus der Epidermis (STRASESKI et al. 2009), insbesondere in den proliferierenden Basalzelllagen. Dies wird durch die Ergebnisse des Sauerstoffentzugs deutlich, die eine Verminderung der Zellviabilität und Veränderung der Zellmorphologie zeigen. Die Adaptationsmechanismen der Keratinozyten sichern durch Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus das Zellüberleben. Dies wird jedoch vermutlich von einer Anpassung der Zellfunktionen sowie einer damit verbundenen Veränderung der Zelldifferenzierung begleitet, wodurch sich die reduzierte Zellviabilität und die hohen LDH-Aktivitäten bei gleichbleibender Zellzahl sowie die Zellmorphologie mit beginnender Stratifizierung der Zellen erklären lassen.

6.2.2 Effekt eines Glukoseentzuges auf die Zellviabilität der Keratinozyten

Infolge eines 96-stündigen Glukoseentzuges konnte in zwei von drei Versuchen eine signifikant reduzierte LDH-Aktivität beobachtet werden. Dieser signifikante Unterschied war während der Langzeitbeobachtung über drei Wochen ebenfalls in allen Versuchen zu erkennen. Im MTT-Assay konnte weiterhin in zwei von drei Versuchen eine signifikant verminderte mitochondriale Aktivität nachgewiesen werden, die eine zeitabhängige Reduzierung der Zellviabilität erkennen ließ. In der Langzeituntersuchung war die Zellviabilität ebenfalls signifikant vermindert und zeigte im Vergleich zur Kurzzeitanalyse niedrigere Werte, jedoch war in der letzten Messung nach drei Wochen noch immer eine deutliche Aktivität und somit Zellviabilität im Vergleich zur OGD-Gruppe zu erkennen. Unter Berücksichtigung der veränderten Zellmorphologie, die mit zunehmendem Zelltod, Zellveränderungen mit Karyopyknose, einer Auflösung des Zellverbands und einer beginnenden Stratifizierung einherging und ebenfalls in Abhängigkeit von der Zeit eine Zunahme der Veränderungen zeigte, weisen diese

gemeinsam mit den verringerten LDH-Aktivitätswerten auf eine stark reduzierte Zellviabilität und Lebensfähigkeit der Keratinozyten hin. Die beginnende Stratifizierung kann weiterhin auf eine gesteigerte Zelldifferenzierung hindeuten, die in Kapitel 6.3 näher erläutert wird.

Eine veränderte Zellmorphologie infolge eines Glukoseentzugs konnten ebenfalls FRENCH und POLLITT (2004) in einem epidermalen Explant aus dem Pferdehuf nachweisen. Diese umfasste in den Basalzellen einen Zusammenbruch des Zytoskeletts und den Abbau der Hemidesmosomen sowie eine Trennung der dermo-epidermalen Verbindung. Da ein Glukosemangel und die damit verbundene Störung der oxidativen Phosphorylierung den Aufbau der zellulären Verbindungen und die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen negativ beeinflusst, verdeutlichten FRENCH und POLLITT (2004) damit die Bedeutung von Glukose für die Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität.

So repräsentiert Glukose in einer Vielzahl an Geweben die Hauptenergiequelle für energieverbrauchende biosynthetische Vorgänge (BONORA et al. 2012, LUNT und VANDER HEIDEN 2011, SPRAVCHIKOV et al. 2001), zu denen die Zellteilung, aber auch die Organisation des Zytoskeletts, die DNA-Synthese und der Proteinumsatz gehören. Weiterhin liefert sie die Vorstufen für chemische Komponenten wie Nukleotide, Aminosäuren und Lipide, die für die Biosynthese von Bedeutung sind (LUNT und VANDER HEIDEN 2011). Glukose wird in drei aufeinanderfolgenden Prozessen zur ATP-Gewinnung katabolisiert (BONORA et al. 2012). Im ersten Schritt wird Glukose nach Aufnahme in die Zelle über die im Zytoplasma stattfindende Glykolyse unter geringer ATP-Bildungsrate zu Pyruvat abgebaut. Anschließend erfolgt die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, welches in den Citratzyklus der Mitochondrien für die Bildung von NADH eingeht. Letztendlich erfolgt in der Atmungskette mittels oxidativer Phosphorylierung die Bildung von bis zu 36 Molekülen ATP (BONORA et al. 2012, LUNT und VANDER HEIDEN 2011).

Epidermale Keratinozyten verfügen ebenfalls über verschiedene Adaptationsmöglichkeiten ihres Stoffwechsels und ihrer Zellfunktionen an sich verändernde Glukosekonzentrationen. So können sie sich einerseits physiologisch-bedingten Veränderungen der Glukosekonzentration durch zunehmende Entfernung zum dermalen Gefäßsystem anpassen und andererseits kurzzeitige pathophysiologische Glukosedefizite tolerieren. So untersuchten RONQUIST et al. (2003) die mitochondriale Morphologie epidermaler Zellen und konnten in den Keratinozyten der Basalzellschicht voll ausgebildete und funktionsfähige Mitochondrien als Ergebnis ihrer Nähe zum dermalen Gefäßsystem und ihrem erhöhten Energiebedarf nachweisen. Die Keratinozyten der suprabasalen Zellschichten der Epidermis hingegen wiesen eine veränderte Mitochondrienmorphologie auf, die sich durch kleine Mitochondrien mit wenigen bis feh-

lenden Cristae und einem verkleinerten Intermembranraum auszeichneten. Da die ATP-Produktion nachweislich mit der Anzahl der Mitochondrien und deren Cristae korreliert, zieht eine verkleinerte Oberfläche der inneren Membran eine veränderte oxidative Phosphorylierung der Glukose und damit eine verminderten ATP-Produktion mit sich (RONQUIST et al. 2003). RONQUIST et al. (2003) begründen die Beeinflussung der mitochondrialen Struktur und des Glukosemetabolismus mit der zunehmenden Distanz zum dermalen Kapillarsystem und der damit verbundenen Abnahme der Sauerstoffkonzentration, da somit keine oxidative Phosphorylierung möglich sei (RONQUIST et al. 2003). Hier sollte jedoch ebenfalls die verminderte Glukoseverfügbarkeit und der mit einer fortschreitenden Zelldifferenzierung einhergehende herabregulierte Zellmetabolismus in den oberen Epidermisschichten beachtet werden.

Des Weiteren wird die Expression transmembraner Glukosetransporter (GLUT) in der Epidermis dem Differenzierungsverlauf angepasst. Spezifisch für die Epidermis ist die Expression von GLUT 1 (LUNT und VANDER HEIDEN 2011, SHEN et al. 2000), jedoch konnten SHEN et al. (2000) ebenfalls GLUT 2, 3 und 5 nachweisen. Sie wiesen in proliferierenden Keratinozyten mit einer hohen Glukosetransportrate eine hohe Expression an verschiedenen GLUT nach. Mit Einsetzen der Zelldifferenzierung kam es zu einer verminderten Expression von GLUT 1, 2 und 5, die mit einer herabgesetzten Glukosetransportrate einhergeht (SHEN et al. 2000). Dies deutet auf einen reduzierten Glukosebedarf differenzierter Keratinozyten in den oberen Zellschichten hin und stützt die Ergebnisse von RONQUIST et al. (2003), die in den suprabasalen Keratinozyten eine veränderte Mitochondrienmorphologie und damit reduzierte oxidative Phosphorylierung feststellten. Somit passen die Keratinozyten den Glukosetransport in die Zelle an die Glukoseverfügbarkeit des umgebenden Milieus und dem Glukosebedarf der Zelle an, der sich physiologisch im Laufe der Zellmigration vom Stratum basale zum Stratum corneum, das aus nicht mehr vitalen Korneozyten besteht, ändert.

Um bei vorübergehenden pathologischen Glukoseunterversorgungen die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen und die Energiegewinnung der Zelle gewährleisten zu können, weisen die Keratinozyten auch hier eine Adaptationsmöglichkeit zur Überbrückung dieses Defizits auf. Ein solcher Anpassungsmechanismus ist die Speicherung von Glukose in Form von Glykogen im Zytoplasma der Keratinozyten. Bei Eintreten eines Glukosemangels können die Zellen das Glykogen unverzüglich für die Energiegewinnung mobilisieren und für die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen verwenden (vgl. Kapitel 6.2.1) (PELLETIER et al. 2012, STRASESKI et al. 2009). Diese Glykogenspeicher sind unter normoxischen Bedingungen insbesondere in den suprabasalen Zellschichten und damit mit einer gewissen Entfernung zum mikro-

vaskulären Gefäßsystem zu finden. Jedoch fehlen sie in der Basalzellschicht (STRASESKI et al. 2009), sodass basale Keratinozyten bei einer Störung der Glukosezufuhr keine Energiereserven besitzen. Demnach kommt den Glykogenvorräten während einer Glukoseunterversorgung eine große Bedeutung für das Zellüberleben zu (TAKAHASHI et al. 2002), die unter physiologischen Umständen vorhanden ist oder infolge eines pathophysiologischen Glukosemangels auftritt. Dabei stellt sich die Frage, inwiefern die Keratinozyten in der vorliegend beschriebenen Studie über Glykogenspeicher verfügten, die für die Aufrechterhaltung der Zellviabilität genutzt werden konnten.

Ein weiterer Adaptationsmechanismus bei eintretendem Glukosemangel ist die Fähigkeit der Zellen, Fettsäuren über die β -Oxidation und Aminosäuren abzubauen, um über den Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung Energie bereitstellen zu können (BENARD et al. 2010). Über diese Wege sind die Keratinozyten über eine gewisse Zeit in der Lage, die Zellfunktionen aufrecht zu erhalten. Diese Lipide und Aminosäuren werden jedoch für die Energiegewinnung aufgebraucht und stehen für die Biosynthese nicht mehr zur Verfügung, sodass eine Abnahme der Zellviabilität sowie ein Zellzusammenbruch mit Zelltod folgt.

Auffallend sind die in der Kurzzeitanalyse im Vergleich zu den Kontrollen niedrigeren LDH-Aktivitätswerte, da hier infolge der starken morphologischen Zellveränderungen und der Auflösung des Zellverbandes von einer gesteigerten LDH-Aktivität auszugehen ist. Jedoch wird LDH über die Substratverfügbarkeit reguliert. So kommt es infolge hypoglykämischer Bedingungen und damit einer verminderten Glukose- und folglich Pyruvatverfügbarkeit zu einer reduzierten LDH-Aktivität (TSOI et al. 2001). Mithilfe der beobachteten morphologischen Veränderungen konnten hier fehlerhafte Interpretationen der niedrigen LDH-Aktivitäten vermieden werden.

Die Diskrepanz zwischen der im MTT-Assay gemessenen Zellviabilität und den deutlichen Veränderungen der Zellmorphologie, die mit dem Zelltod einhergehen, wurde bereits in Kapitel 6.1.3.2 erläutert. Sie kann auf noch funktionsfähige und metabolisch aktive Mitochondrien während der frühen Phase der Apoptose zurückzuführen sein, die damit weiterhin zur MTT-Reduktion befähigt sind (HAYON et al. 2003).

Erfolgt demnach bei einem Glukosedefizit ein rascher Verbrauch der Energiereserven sowie der Lipide und Aminosäuren, hat dies innerhalb kurzer Zeit unweigerlich den Zusammenbruch der Zellfunktionen und metabolischen Prozesse und damit den Zelltod zur Folge (TAKAHASHI et al. 2002). Für die energieverbrauchenden Prozesse der Zellen in der vorliegenden Arbeit standen nicht mehr genügend ATP und biosynthetische Moleküle für die Gewebemöostase und die Aufrechterhaltung lebenswichtiger zellulärer Funktionen zur Verfügung, sodass dies eine reduzierte Zellviabilität und den Zellzusammenbruch zur Folge hatte. Dies wird ebenfalls durch

die morphologischen Veränderungen der Keratinozyten deutlich, die einen mit der reduzierten Zellviabilität einhergehenden Zellzusammenbruch infolge des Mangels an Energie und Makromolekülen für die Zytoskeletterhaltung, DNA-Reparatur und Zellneubildung erkennen lassen.

Ein Glukosedefizit der epidermalen Keratinozyten kann in vivo durch intrinsische Faktoren, wie beispielsweise eine Störung der GLUT-Expression (MOBASHERI et al. 2004) oder eine veränderte dermale Mikrozirkulation (BERGSTEN 2003, HOBLET und WEISS 2001), sowie durch extrinsische Faktoren wie eine Glukoseunterversorgung gefördert werden. So kann ein vermehrtes Auftreten der CHD im peripartalen Zeitraum beobachtet werden (TARLTON et al. 2002, VERMUNT 2005), der durch metabolische Imbalancen, Fütterungsumstellungen und Änderungen des Energie- und Fettstoffwechsels gekennzeichnet wird. Die Veränderungen des Körperstoffwechsels werden durch den nun hohen Energiebedarf des Tieres infolge der beginnenden Laktation sowie der Aufrechterhaltung der Körperfunktionen, des Wachstums und der Reproduktion bedingt (VERMUNT 2005). Dies führt in vielen Fällen zu einer negativen Energiebilanz der Rinder, einem Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -bedarf, sodass körpereigene Energiereserven zum Ausgleich des Energiedefizits mobilisiert werden müssen (SPURLOCK et al. 2012). Neben einer gesteigerten Mobilisierung freier Fettsäuren aus dem Fettgewebe und einer gesteigerten Ketonkörperbildung in der Leber resultiert eine verminderte Glukoseverfügbarkeit im Blut (MCART et al. 2013). Der erniedrigte Blutglukosespiegel kann eine Erklärung für das vermehrte Auftreten der CHD im peripartalen Zeitraum sein (HOBLET und WEISS 2001), da dies zu einer Glukoseunterversorgung der Keratinozyten der Klauenepidermis führen würde. Als Folge käme es zu einer Abnahme der Zellproliferation und Zellviabilität sowie einer Störung der Zelldifferenzierung, die schließlich in einer dermo-epidermalen Zusammenhangstrennung und gestörten Hornbildung resultieren würden, wie sie für die CHD beschrieben werden (MÜLLING und LISCHER 2002, VERMUNT 2007).

6.2.3 Effekt einer Ischämie auf die Zellviabilität der Keratinozyten

Der gleichzeitige Sauerstoff- und Glukoseentzug ging in der Kurzzeitanalyse bereits nach 24 Stunden mit einer signifikant erhöhten LDH-Aktivität einher, die anschließend in Abhängigkeit von der Zeit abnahm. In der Langzeituntersuchung zeigte die OGD-Gruppe die niedrigsten LDH-Aktivitäten, die auch hier noch zeitabhängig abnahmen und nach drei Wochen in allen Versuchen gerade noch messbare Ergebnisse aufwiesen. Im MTT-Assay zeigte sich während der 96-stündigen Versuchsdauer eine signifikant erniedrigte Zellviabilität, die jedoch mit Schwankungen verbunden

war und gegen Ende einen leichten Anstieg erkennen ließ. In der Langzeitanalyse konnte hier im Vergleich zu den anderen Versuchsbedingungen die niedrigste Zellviabilität nachgewiesen werden, die eine zeitabhängige Abnahme aufwies und nach drei Wochen ebenfalls gerade noch messbare Werte annahm. Die gemessene Abnahme der Zellviabilität wurde von starken morphologischen Veränderungen begleitet, die sich durch zunehmende Karyopyknose, Auflösung des Zellverbandes, beginnende Zelldifferenzierung sowie Zelltod auszeichneten. Nach drei Wochen waren schließlich lediglich vereinzelte Zellen vorhanden.

Ähnliche Auswirkungen auf die Zellviabilität infolge eines gleichzeitigen Sauerstoff- und Glukoseentzugs konnten in verschiedenen Zellarten, wie Astrozyten, Fibroblasten und Tumorzellen nachgewiesen werden (CAO et al. 2010, PELLETIER et al. 2012). CAO et al. (2010) konnten in Astrozyten infolge einer OGD eine zeitabhängige Abnahme des intrazellulären ATP-Gehalts und eine veränderte Mitochondrienfunktion sowie den Verlust zytosolischer Enzyme und Metaboliten nachweisen, die eine Abnahme der Zellviabilität nach sich zogen (CAO et al. 2010). Eine stark reduzierte ATP-Bildung ist die direkte Konsequenz einer Ischämie (SIMS und MUYDERMAN 2010). PELLETIER et al. (2012) wiesen in verschiedenen hypoxischen Zellen ohne Glykogenvorräte in der Abwesenheit von Glukose ein massives Zellsterben von 80% nach. Mit hohen Glykogenreserven, die infolge einer Präkonditionierung in hypoxischem Milieu gebildet wurden, wiesen die Zellen hingegen eine hohe Überlebensfähigkeit auf. Jedoch konnte eine Abnahme des Glykogengehalts infolge der OGD nachgewiesen werden (PELLETIER et al. 2012). Da keine Präkonditionierung in der vorliegend beschriebenen Untersuchung durchgeführt wurde, ist anzunehmen, dass die Keratinozyten zwar zu Versuchsbeginn über moderate Glykogenspeicher verfügten, diese aber ab Beginn der OGD für die Energiegewinnung und Aufrechterhaltung der Zellfunktionen innerhalb kurzer Zeit verbraucht wurden, sodass die zytotoxischen Effekte und die Abnahme der Zellviabilität bereits nach 24 Stunden eintraten.

Bei einem gleichzeitigen Sauerstoff- und Glukoseentzug wirken die in den Kapiteln 6.2.1 und 6.2.2 erläuterten Zellmechanismen zusammen, sodass schon nach kurzer Expositionszeit die ersten Zellveränderungen auftreten. Zum einen müssen die Keratinozyten aufgrund der Hypoxie ihre Energie durch den anaeroben Metabolismus gewinnen. Da hier infolge des gleichzeitigen Glukosemangels das Hauptsubstrat für die Energiegewinnung nicht vorhanden ist, können die in 6.2.1 diskutierten Adaptationsmechanismen nicht wirkungsvoll greifen. Weiterhin können die Keratinozyten unter den hypoxischen Gegebenheiten den Abbau von Fettsäuren und Aminosäuren nicht für die Energiegewinnung im Citratzyklus nutzen, da dies ausschließlich unter aeroben Bedingungen möglich ist. Lediglich die glukogenen Aminosäuren können

über den Abbau zu Glukose in der anaeroben Glykolyse zur ATP-Gewinnung verwendet werden. Damit lässt sich die unter ischämischen Bedingungen zwar reduzierte Zellviabilität, aber dennoch längere Lebensdauer der Keratinozyten erklären. Die im Vergleich zum Glukoseentzug über lange Zeit bessere Zellmorphologie kann auf die noch vorhandene niedrige Energiegewinnung sowie auf die Verfügbarkeit von Lipiden und Aminosäuren für die Biosynthese und damit die Aufrechterhaltung der Zelle zurückzuführen sein. Ob die durch den Aminosäureabbau gebildete Glukose als Glykogen gespeichert wird, ist fraglich, da zum einen infolge der anaeroben Glykolyse der Energiegewinn reduziert ist und zum anderen die Glukose vermutlich unverzüglich verstoffwechselt wird. Die stark verminderte Zellviabilität in der Langzeitexposition lässt darauf schließen, dass die für die Energiegewinnung nutzbaren Substrate aufgebraucht und keine ATP-Gewinnung sowie Biosynthese mehr möglich sind.

Die zu Versuchsbeginn höchsten LDH-Aktivitäten könnten zum einen auf einen raschen zytotoxischen Effekt infolge eines ATP-Mangels sowie zum anderen auf eine mögliche Hochregulierung der LDH infolge der Hypoxie zurückzuführen sein. Da der Zellverband über lange Zeit intakt erscheint und Zeichen der Stratifizierung im Verlauf der Untersuchung auftreten, weist dies auf eine mögliche beginnende und verstärkte Zelldifferenzierung hin, an deren Ende der ausdifferenzierte und nicht mehr lebensfähige Korneozyt steht, was ebenfalls zur einer verstärkten LDH-Freisetzung führen würde. Weiterhin sollte eine mögliche Zellschädigung durch die erhöhte Laktatbildung infolge der anaeroben Glykolyse in Betracht gezogen werden, die zu einer Erniedrigung des pH-Wertes führt (SIMS und MUYDERMAN 2010).

Ischämische Bedingungen, wie sie in der Studie mittels OGD demonstriert werden, entstehen infolge einer gestörten Blutzirkulation, die eine Beeinträchtigung der Sauerstoff- und Glukoseversorgung bewirkt. Damit entsteht ein Ungleichgewicht zwischen ATP-Verbrauch und -produktion, sodass ein rapider Abfall des Glukose- und ATP-Gehalts der Zelle folgt (SIMS und MUYDERMAN 2010). Solch eine Störung der Blutzirkulation mit daraus resultierender epidermaler Ischämie wird im Rahmen der CHD diskutiert (vgl. Kap. 2.2.3). Damit einhergehend wird ein verändertes Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Keratinozyten vermutet (MÜLLING und LISCHER 2002). Die in der vorliegend dokumentierten Untersuchung festgestellte Abnahme der Zellviabilität weist auf eine veränderte Proliferation hin, da proliferierende Zellen eine erhöhte Glykolyse infolge eines gesteigerten Bedarfs an ATP und biosynthetischen Molekülen aufweisen. Unter ischämischen Bedingungen kann dieser Bedarf nicht gedeckt werden, sodass dies eine Proliferationsabnahme zur Folge hat. Ein ATP-Mangel zieht außerdem einen Zusammenbruch der Zellfunktionen und damit den Zelltod nach sich, was letztendlich in einer dermo-epidermalen Zusam-

menhangstrennung (OSSENT und LISCHER 1998, VERMUNT 2007) sowie einer Beeinträchtigung der Hornproduktion mündet, wie sie im Falle einer CHD beschrieben werden (DANSCHER et al. 2010, HOBLET und WEISS 2001). Auch hier weist die ischämiebedingte Zellmorphologie auf eine veränderte Zelldifferenzierung hin, die in Kapitel 6.3 diskutiert wird.

6.3 Verändertes Differenzierungsverhalten infolge ischämischer, hypoxischer und hypoglykämischer Bedingungen

Für die Untersuchung der Zelldifferenzierung infolge der veränderten Kultivierungsbedingungen über 96 Stunden wurden die Antikörper gegen die terminalen Differenzierungsmarker Involukrin und Lorikrin verwendet, die beide ein sauerstoffabhängiges Expressionsverhalten aufweisen (CHOU et al. 2004, NGO et al. 2007).

In der Western Blot-Analyse zeigten Involukrin und Lorikrin nach einer Exposition über 72 Stunden eine zeitabhängige Zunahme der Expression, auf die eine Expressionsabnahme nach 96 Stunden folgte. Die höchste Expression beider Differenzierungsmarker zeigten dabei die Keratinozyten infolge eines Glukoseentzugs. Für die OGD-Gruppe war eine Datenerhebung nach 96 Stunden nicht möglich, da der Proteingehalt der Keratinozyten für die Western Blot-Analyse zu gering war. Dies kann auf eine Beeinträchtigung der Energiegewinnung sowie der Biosynthese der Keratinozyten zurückzuführen sein. Die stärkste Involukrin- und Lorikrin-Expression konnte infolge eines Glukoseentzugs gemessen werden. Weiterhin zeigten die Keratinozyten eine deutlich höhere Expression von Involukrin als Lorikrin. Im Folgenden wird der Differenzierungsmechanismus anhand von Involukrin erläutert. Da die Ergebnisse der Involukrin- und Lorikrin-Expression eng miteinander korrelierten und beide Moleküle wie in 2.1.4.5 erläutert denselben zellulären Mechanismen unterliegen (CANDI et al. 2005, NEMES et al. 1999), kann davon ausgegangen werden, dass für Lorikrin identische Regulationsmechanismen vorliegen.

Eine zunehmende Involukrinexpression wiesen ebenfalls CHOU et al. (2004) unter hypoxischen Bedingungen mit abnehmender Sauerstoffkonzentration nach, die zudem eine Abhängigkeit von der Expositionsdauer aufwies (CHOU et al. 2004). Eine Korrelation zwischen Hypoxie und Involukrin-Expression konnte ebenfalls durch AZUMA et al. (2003) bestätigt werden. Solch ein Expressionsverhalten wird infolge hoher extrazellulärer Kalziumkonzentrationen beschrieben, wodurch die Expression von Involukrin, Lorikrin und weiteren Strukturproteinen in Keratinozyten induziert wird (CHOU et al. 2004). So beschreiben CHOU et al. (2004) eine Interaktion zwischen einer hypoxie- und kalziuminduzierten Involukrin-Expression, die vermutlich HIF-1-

unabhängig ist (CHOU et al. 2004). Durch steigende Kalziumkonzentrationen beginnen Keratinozyten zu differenzieren und weisen ein erniedrigtes mitochondriales Membranpotential auf. Dies bestärkt die Annahme, dass die Zelldifferenzierung auf eine kalziumbedingte Depolarisation zurückgeführt werden kann (SAVIGNAN et al. 2004). Solch eine zelluläre Depolarisation bewirken auch hypoxische und ischämische Konditionen, in deren Folge die Zellen den Großteil des extrazellulären Kalziumgehalts aufnehmen (KRISTIAN 2004). Des Weiteren kommt es infolge der stattfindenden anaeroben Glykolyse zu einer vermehrten Bildung von Laktat und H^+ und damit zu einem Abfall des zellulären pH-Wertes (KALOGERIS et al. 2012, KRISTIAN 2004). Über eine Reihe verschiedener Ionen-Transportsysteme findet ein Ausgleich des pH-Wertes statt, aus dem eine intrazelluläre Kalziumerhöhung resultiert. Infolge des vorhandenen ATP-Mangels kann das Kalzium jedoch nicht aktiv aus der Zelle ausgeschleust werden (KALOGERIS et al. 2012). Somit bewirken eine Hypoxie und Ischämie erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen sowie die Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivierendes Protein 1), welcher in die Zellproliferation, -differenzierung sowie -apoptose involviert ist (CHOU et al. 2004). Hier sollte in Betracht gezogen werden, dass in der Epidermis unter physiologischen Bedingungen ein Kalziumgradient vorhanden ist, der von der Basalzellschicht zu den oberen Zellschichten zunimmt. Damit einher gehen die Stratifizierung und die terminale Differenzierung der Keratinozyten (NEMES et al. 1999). Gleichzeitig entwickelt sich in der Epidermis mit zunehmender Entfernung zum mikrovaskulären Gefäßsystem ein hypoxisches Milieu (BEDOGNI et al. 2005). So ist eine zunehmende Expression der terminalen Differenzierungsmarker unter hypoxischen Bedingungen einerseits ein physiologischer Prozess epidermaler Keratinozyten. Andererseits lässt sich in der vorliegend beschriebenen Studie das Differenzierungsverhalten der Keratinozyten unter pathologischer Hypoxie oder Ischämie erklären, die eine vermehrte und zeitabhängige Steigerung der Expression von Involukrin und Lorikrin nach sich ziehen. So bewirkt eine verminderte Sauerstoff- und Glukoseversorgung in der Basalzellschicht eine verfrühte Zelldifferenzierung infolge der gesteigerten Kalziumaufnahme in den Basalzelllagen und eine Störung der Zellproliferation. Dies führt bereits in den unteren Zellschichten zu einer abnormen Expression der Differenzierungsmarker, wie in der vorliegend dokumentierten Untersuchung am Beispiel von Involukrin und Lorikrin demonstriert wurde. Solch eine veränderte Zelldifferenzierung wird im Zusammenhang der CHD diskutiert (MÜLLING und LISCHER 2002).

Die gesteigerte Expression der Differenzierungsmarker infolge eines Glukoseentzugs kann auf einen ATP-Mangel zurückzuführen sein, der eine Inaktivierung der für den Ionen-transport zuständigen ATPasen zur Folge hat. Folglich wird der aktive Kalzi-

umausstrom reduziert, woraus ebenfalls eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration und damit gesteigerte Zelldifferenzierung resultieren (KALOGERIS et al. 2012). Die Abnahme der Involukrin- und Lorikrin-Expression gegen Ende der Versuchsdauer könnte auf einen Verbrauch der Glukose sowie einen Glukosemangel zurückzuführen sein. Dies würde zum einen eine verminderte Verfügbarkeit an biochemischen Komponenten wie Nukleotide, Aminosäuren und Lipide für die Biosynthese mit sich bringen (LUNT und VANDER HEIDEN 2011). Zum anderen stünde für die energieverbrauchenden biosynthetischen Vorgänge weniger ATP zur Verfügung (BONORA et al. 2012, LUNT und VANDER HEIDEN 2011, SPRAVCHIKOV et al. 2001). Daraus würde letztendlich eine verminderte Proteinbiosynthese, wie hier in Form von Involukrin und Lorikrin, resultieren.

Kritisch zu betrachten sind die Ergebnisse der Lorikrin-Expression, die deutlich niedrigere Werte als Involukrin sowie weniger intensiv gefärbte Proteinbanden zeigen. Da Lorikrin zum einen die Hauptkomponente des cornified envelope (CE) der differenzierten Keratinozyten verkörpert und zum anderen 70 bis 85% des Gesamtproteingehalts der verhornten Epidermisschichten ausmacht (CANDI et al. 2005), sollte die Spezifität des verwendeten Antikörpers sowie seine Eignung für die Western Blot-Analyse hinterfragt werden.

Auffällig sind weiterhin die zusätzlich markierten Proteinbanden nach erfolgter Inkubation mit dem Antikörper gegen Involukrin. Dabei handelt es sich um Proteinbanden in der Höhe von etwa 90 kDa und 35 kDa. Die detektierten Banden bei 90 kDa würden dem Molekulargewicht der Transglutaminasen (TG) entsprechen. So wird Involukrin als ein frühes Strukturprotein durch Quervernetzung mittels der TG 1,3 und 5 an das CE gebunden (CANDI et al. 2005, CANDI et al. 1995, NEMES et al. 1999), sodass ein Gerüst für die Bindung weiterer Proteine, wie beispielsweise Lorikrin, gebildet wird (CANDI et al. 2005, NEMES et al. 1999). Während der Quervernetzung von Involukrin verwenden die kalziumabhängigen TG (CANDI et al. 2005, NEMES et al. 1999) als Substrat Glutamin, das in den 37 Aminosäurewiederholungen von Involukrin vorkommt (ECKERT et al. 2005). So ist es möglich, dass das mit dem Antikörper gebundene N-terminale Ende von Involukrin, an Transglutaminase gebunden vorliegt. Eine weitere Möglichkeit ist eine Quervernetzung des Involukrins mit einem weiteren Strukturprotein, wodurch eine höhere Molekülmasse erreicht wird.

Die niedrigmolekularen Proteinbanden bei etwa 35 kDa könnten den Proteinbanden von Lorikrin entsprechen. Lorikrin, vernetzt mit den SPRPs, wird mittels der TGs auf dem aus Involukrin, Elafin und weiteren Proteinen bestehenden Gerüst abgelagert (CANDI et al. 2005). Somit könnten die Banden entweder auf vernetzte Involukrinmoleküle oder -fragmente oder auf einzeln vorliegende Involukrinfragmente hinweisen. Ob der verwendete Antikörper gegen Involukrin aufgrund der ähnlichen Molekülstruk-

turen eine Affinität für Lorikrin aufweist, ist fraglich. Um die zusätzlich markierten Proteinbanden identifizieren und charakterisieren zu können, sollte in einer weiterführenden Untersuchung eine Proteinsequenzierung dieser Banden durchgeführt werden.

Zusammenfassend konnte in der Western Blot-Analyse eine abnorme Zelldifferenzierung infolge einer OGD, einer Hypoxie sowie eines Glukoseentzugs gezeigt werden, die mit einer hochregulierten Expression der terminalen Differenzierungsmarker einherging. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der veränderten Zellmorphologie. So bewirkt eine verminderte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, wie sie während einer CHD beschrieben wird, eine pathophysiologische Schädigung der proliferierenden und hornbildenden Zellen und eine Degeneration der dermo-epidermalen Verbindung (HOBLET und WEISS 2001, VERMUNT 2007). Aus der veränderten Zelldifferenzierung, die infolge ischämischer Bedingungen bereits in den Basalzelllagen einsetzt, resultiert die Bildung eines minderwertigen Horns sowie eine vermehrte Hornproduktion und damit die Bildung von Reheringen (OSSENT und LISCHER 1998).

6.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig ein In-vitro-Ischämiemodell basierend auf bovinen Keratinozyten aus der Klauenepidermis erfolgreich etabliert werden. Solch ein epidermales In-vitro-Modell stellt ein leistungsfähiges System für die Untersuchung der molekularbiologischen und morphologischen Gewebereaktionen dar (STRASESKI et al. 2009), die durch einen gleichzeitigen oder separaten Sauerstoff- und Glukoseentzug verursacht werden. Dies war zum einen von Interesse, da Keratinozyten während ihrer Migration in die oberen epidermalen Zellschichten unter physiologischen Bedingungen einem hypoxischen Milieu ausgesetzt werden und über diverse Adaptationsmechanismen an eine Hypoxie verfügen (BEDOGNI und POWELL 2009, STRASESKI et al. 2009). Zum anderen ermöglichte es die Untersuchung pathophysiologischer Reaktionen der Keratinozyten auf eine Ischämie, die mit einer veränderten Zellviabilität und Zelldifferenzierung einhergehen, wie im Falle der bovinen Klauenrehe in vivo. Hier tritt infolge einer gestörten dermalen Mikrozirkulation eine Ischämie der basalen Epidermisschichten auf, die eine Störung der epidermalen Zellproliferation, eine Schädigung der dermo-epidermalen Verbindung sowie eine veränderte Keratinisierung und Hornproduktion nach sich zieht (MÜLLING und LISCHER 2002, VERMUNT 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Monolayerkultur verwendet. Dadurch konnten die komplexen Wechselwirkungen mit dermalen Komponenten reduziert und eine getrennte Untersuchung zellulärer Reaktionsmechanismen der Keratinozyten ermöglicht werden (LEMPER et al. 2014,

POUMAY und COQUETTE 2007). Jedoch sollte die fehlende Interaktion mit der Dermis und deren Einfluss auf die Zellproliferation und -differenzierung kritisch betrachtet und das Modell nicht unreflektiert der Epidermis in vivo gleichgesetzt werden (DEYRIEUX und WILSON 2007, LEMPER et al. 2014). Es bietet die Möglichkeit, Explants oder Kokulturen basierend auf dermalen und epidermalen Anteilen zu verwenden, um die molekularbiologischen Abläufe, wie die Zelldifferenzierung und die Keratinisierung, unter gegenseitiger Wechselwirkung von Dermis und Epidermis zu untersuchen (LEMPER et al. 2014, POUMAY und COQUETTE 2007).

Trotz der hier gewonnenen wertvollen Informationen zur Zellviabilität und zum Differenzierungsverhalten der Keratinozyten infolge einer initialen Ischämie, wirft die Pathogenese der CHD noch immer viele Fragen auf, sodass weiterführende Untersuchungen mithilfe des etablierten Ischämiemodells von großer Bedeutung sind. Einen Forschungsschwerpunkt der CHD stellt die Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 dar, die durch hypoxische Konditionen begünstigt wird (MEDINA-TORRES et al. 2011) und eine dermo-epidermale Zusammenhangstrennung (HENDRY et al. 2003, KNOTT et al. 2007) sowie eine veränderte Keratinisierung und Hornbildung nach sich zieht (HENDRY et al. 2003). Ein weiterer Untersuchungsaspekt ist außerdem die Aktivierung von HIF-1 sowie die daraus resultierende Steigerung der VEGF-Expression infolge ischämischer und hypoxischer Bedingungen. Diese bewirkt eine Aktivierung angiogener Prozesse (LUNT und VANDER HEIDEN 2011, MIAO et al. 2013), um die Erneuerung der pododermalen Angioarchitektur zu ermöglichen (HIRSCHBERG und PLENDL 2005). Weiterhin bewirkt HIF-1 eine veränderte Expression diverser GLUT (LUNT und VANDER HEIDEN 2011, MIAO et al. 2013). Eine verminderte Expression der GLUT wurde bereits im Rahmen der equinen Hufrehe nachgewiesen und ist im Rahmen der CHD ebenfalls denkbar. Eine weitere Einsatzmöglichkeit des etablierten In-vitro-Ischämiemodells bietet die Untersuchung zellulärer Mechanismen im Rahmen von Wundheilungsstörungen und Hauterkrankungen.

Neben einem besseren Verständnis der physiologischen Zellmechanismen der Epidermis und der frühen zellulären Mechanismen infolge ischämischer Konditionen (GILL et al. 2010), stellt das hier etablierte Ischämiemodell eine wertvolle Verbindung zwischen den stoffwechselbedingten Veränderungen, die zu einer CHD führen, und den daraus resultierenden molekularbiologischen Reaktionsabläufen in der Klauenepidermis her. Das in dieser Arbeit etablierte und experimentell eingesetzte In-vitro-Ischämiemodell bildet eine wichtige Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Klärung der Pathogenese der CHD, die neue Einblicke in dieses bedeutende Problem der Rinderhaltung versprechen.

7 Zusammenfassung

Katharina Lübke

Entwicklung und Einsatz eines In-vitro-Ischämiemodells zur Untersuchung zellulärer Pathomechanismen der Klauenreihe des Rindes

Veterinär-Anatomisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Dezember 2014

(106 Seiten, 14 Abbildungen, 38 Tabellen, 130 Literaturangaben, Anlagen)

Schlüsselwörter: Keratinozyten, Epidermis, Rinderklaue, claw horn disruption, Ischämiemodell

Einleitung

Die subklinische Klauenreihe oder claw horn disruption (CHD) ist von großer wirtschaftlicher Bedeutung für die Rinderhaltung, da sie zu Lahmheiten, Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens sowie einer eingeschränkten Leistungsfähigkeit der Tiere führt. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die pathophysiologischen Grundlagen der CHD noch immer nicht vollständig geklärt. Die derzeitigen Hypothesen weisen auf eine Ischämie in den noch lebensfähigen Epidermisschichten infolge einer veränderten dermalen Mikrozirkulation. Diese hat pathophysiologische Veränderungen zur Folge, die eine Störung der epidermalen Zellproliferation, eine Schädigung der dermo-epidermalen Verbindung sowie eine veränderte Keratinisierung und Hornproduktion umfassen. Von Bedeutung sind daher In-vitro-Ischämiemodelle, um die epidermale Reaktionsmechanismen auf die pathologischen Veränderungen der Dermis zu untersuchen.

Ziel der Untersuchungen

Ziel in der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines In-vitro-Ischämiemodells auf der Grundlage boviner Keratinozyten aus der Klauenepidermis. Mithilfe dieses Modells sollten die zellulären Pathomechanismen infolge einer Ischämie, einer Hypoxie sowie eines Glukoseentzugs untersucht werden. Des Weiteren stand die Analyse des Differenzierungsverhaltens der Keratinozyten infolge ischämischer, hypoxischer und hypoglykämischer Konditionen im Mittelpunkt.

Material und Methoden

Für die Etablierung des In-vitro-Ischämiemodells diente als Grundlage das oxygen glucose deprivation (OGD)-Modell, das die Untersuchung eines gleichzeitigen Sau-

erstoff- und Glukosemangels sowie lediglich einer Hypoxie und eines Glukoseentzugs bei bovinen Keratinozyten ermöglichte. Die Versuche wurden in eine Kurzzeitanalyse über 96 Stunden sowie eine Langzeitanalyse über drei Wochen geteilt. Nach erfolgter Exposition wurde die Zellviabilität mittels LDH(Lactatdehydrogenase)- und MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Assay untersucht. Des Weiteren wurde das veränderte Differenzierungsverhalten der Keratinozyten infolge der veränderten Kultivierungsbedingungen mittels Western Blot-Analyse anhand der Involukrin- und Lorikrin-Expression untersucht.

Ergebnisse

Die Keratinozyten zeigten infolge einer OGD nach kurzer Expositionsdauer die höchsten zytotoxischen Effekte, die von einer zeitabhängigen Abnahme der Zellviabilität sowie massiven morphologischen Veränderungen gefolgt wurde. Hypoxische Bedingungen bewirkten eine zeitabhängige Abnahme der Zellviabilität, die erst nach zweiwöchiger Inkubation die größte Zytotoxizität aufwies, sowie eine geringgradig veränderte Zellmorphologie bei Erhaltung des Zellverbands. Der Glukoseentzug bewirkte eine stark verminderte Zellviabilität sowie starke morphologische Zellveränderungen. In der Western Blot-Analyse konnte eine gesteigerte Involukrin- und Lorikrin-Expression infolge einer OGD, einer Hypoxie und eines Glukoseentzugs nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig ein auf bovinen Keratinozyten basierendes In-vitro-Ischämiemodell etabliert werden, das die Untersuchung zellulärer Mechanismen der Epidermis ermöglichte. Die OGD zeigte den stärksten Einfluss auf die Zellviabilität sowie eine veränderte Zelldifferenzierung der Keratinozyten, was die pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der CHD reflektiert. Die ebenfalls starken Zellveränderungen infolge eines Glukoseentzugs verdeutlichen die Rolle der Glukose im Zellmetabolismus der Keratinozyten. Solch ein epidermaler Glukosemangel ist in Verbindung mit der negativen Energiebilanz der Rinder im peripartalen Zeitraum denkbar. Die Ergebnisse infolge einer Hypoxie verweisen auf vielfältige Adaptationsmechanismen der Keratinozyten an hypoxische Bedingungen, denen sie in der Epidermis in vivo während der Zelldifferenzierung ausgesetzt werden. Damit besitzt das In-vitro-Ischämiemodell ein großes Potenzial für den Einsatz in der Klauenreheforschung, um einerseits die mit einer Ischämie einhergehenden pathologischen Veränderungen der CHD untersuchen zu können. Andererseits liefert das Modell wertvolle Informationen zu den physiologischen Grundlagenmechanismen der Epidermis, die mit der Zelldifferenzierung einhergehen.

8 Summary

Katharina Lübke

Development and experimental application of an in vitro ischemia model for investigating the cellular pathomechanism of laminitis in cattle

Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in December 2014

(106 pages, 14 figures, 38 tables, 130 references, appendix)

Keywords: keratinocytes, epidermis, bovine claw, claw horn disruption, ischemia model

Introduction

The subclinical laminitis or claw horn disruption (CHD) is of great economic importance in the dairy industry as it causes lameness, poor general condition and reduced performance. Despite extensive research efforts, the pathomechanism of CHD remains widely unclear. The current hypotheses on CHD pathogenesis include ischemic alterations of the epidermal keratinocytes resulting from an impaired blood supply. This causes an alteration of cell proliferation, a dermo-epidermal separation and an impaired keratinization and horn production. Therefore, in vitro ischemia models are of critical importance in clarification of the epidermal responses to an altered microcirculation.

Aim of the investigation

The aim of this study was the establishment of an in vitro ischemia model based on bovine claw keratinocytes. This in vitro model should enable the investigation of cellular pathomechanisms following exposure to ischemia, hypoxia and glucose deprivation. An additional aim was the analysis of the differentiation pattern of keratinocytes under ischemic, hypoxic and hypoglycaemic conditions.

Material and methods

To establish the in vitro ischemia model, the keratinocytes were exposed to oxygen-glucose deprivation (OGD). In addition, this model allowed the parallel examination of hypoxic and hypoglycaemic conditions on bovine claw keratinocytes. The experiments were divided into a short-term analysis over 96h and a long-term analysis over three weeks. Measurement of cell viability was performed by LDH(lactatedehydrogenase) and MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assays. Furthermore, the differentiation pattern of the keratinocytes

after exposure to ischemia, hypoxia and glucose deprivation was detected by western blot analysis of the focus on expression of involucrin and loricrin.

Results

The highest cytotoxic effect was measured after short exposure to OGD followed by a time-dependent decrease of cell viability and extensive morphological changes of the keratinocytes. Hypoxic conditions lead to a time-dependent decrease of cell viability with the highest cytotoxicity after two weeks. The keratinocytes showed slight changes in cell morphology while maintaining a confluent cell layer. Exposure of keratinocytes to glucose deprivation showed a high decrease of cell viability and strong morphological changes. Furthermore, western blot analysis showed an altered expression pattern with increased involucrin and loricrin levels after exposure to OGD, hypoxia and glucose deprivation.

Conclusion

The present study established for the first time an in vitro ischemia model based on bovine claw keratinocytes to study the cellular mechanisms of the epidermis. After exposure to OGD, keratinocytes showed the highest loss in cell viability and an altered cell differentiation. This reflects the pathophysiological changes following epidermal ischemia occurring during the pathogenesis of CHD. The massive cellular alterations after glucose deprivation provide good evidence for the importance of glucose in the cellular metabolism of keratinocytes. An epidermal glucose deficiency may occur in combination with a negative energy balance during peripartal period in cattle. The results of hypoxia show the different adaptive mechanisms of keratinocytes to hypoxic conditions which are present in the epidermis during cell differentiation. Thus, the in vitro ischemia model has a great potential for use in research into CHD pathogenesis and pathomechanisms associated with ischemia. On one side, it is possible to investigate the pathological changes following ischemia during CHD. On the other side, the model offers useful information on physiological response mechanisms of the epidermis that correlate with cell differentiation.

9 Literaturverzeichnis

- Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res.* 2000;38(4):325–9.
- Azuma Y, Chou S, Lininger RA, Murphy BJ, Varia MA, Raleigh JA. Hypoxia and differentiation in squamous cell carcinomas of the uterine cervix: pimonidazole and involucrin. *Clin Cancer Res.* 2003;9(13):4944–52.
- Banks-Schlegel S, Green H. Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. *J Cell Biol.* 1981;90(3):732–7.
- Bedogni B, Powell MB. Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(2):166–74.
- Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell.* 2005;8(6):443–54.
- Behrens DT, Villone D, Koch M, Brunner G, Sorokin L, Robenek H et al. The Epidermal Basement Membrane Is a Composite of Separate Laminin- or Collagen IV-containing Networks Connected by Aggregated Perlecan, but Not by Nidogens. *J Biol Chem.* 2012;287(22):18700–9.
- Benard G, Bellance N, Jose C, Melser S, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):698–709.
- Bergsten C. Causes, risk factors, and prevention of laminitis and related claw lesions. *Acta Vet Scand Suppl.* 2003;98:157–66.
- Berry SL. The Three Phases of Bovine Laminitis. Hoof Trimmers Association, Inc. Newsletter. 2001 März:1-3. www.hooftrimmers.org/pdf/hta_laminitis1.pdf.
- Bonora M, Patergnani S, Rimessi A, Marchi E de, Suski JM, Bononi A et al. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal.* 2012;8(3):343–57.
- Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat.* 2009;214(4):516–59.
- Breitkreutz D, Koxholt I, Thiemann K, Nischt R. Skin Basement Membrane: The Foundation of Epidermal Integrity—BM Functions and Diverse Roles of Bridging Molecules Nidogen and Perlecan. *Biomed Res Int.* 2013;2013(4):1–16.
- Budras KD, Wünsche A. Atlas der Anatomie des Rindes: Lehrbuch für Tierärzte und Studierende. Hannover: Schlütersche; 2002.
- Budras KD, Mülling C, Horowitz A. Rate of keratinization of the wall segment of the hoof and its relation to width and structure of the zona alba (white line) with respect to claw disease in cattle. *Am J Vet Res.* 1996;57(4):444–55.

Candi E, Melino G, Mei G, Tarcsa E, Chung SI, Marekov LN et al. Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J Biol Chem.* 1995;270(44):26382–90.

Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(4):328–40.

Cao X, Zhang Y, Zou L, Xiao H, Chu Y, Chu X. Persistent oxygen-glucose deprivation induces astrocytic death through two different pathways and calpain-mediated proteolysis of cytoskeletal proteins during astrocytic oncosis. *Neurosci. Lett.* 2010;479(2):118–22.

Chou S, Azuma Y, Varia MA, Raleigh JA. Evidence that involucrin, a marker for differentiation, is oxygen regulated in human squamous cell carcinomas. *Br J Cancer.* 2004;90(3):728–35.

Cooper D, Sun TT. Monoclonal antibody analysis of bovine epithelial keratins. Specific pairs as defined by coexpression. *J. Biol. Chem.* 1986;261(10):4646–54.

Danscher A, Toelboell T, Wattle O, Danscher AM, Toelboell TH. Biomechanics and histology of bovine claw suspensory tissue in early acute laminitis. *J Dairy Sci.* 2010;93(1):53–62.

Deyrieux AF, Wilson VG. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology.* 2007;54(2):77–83.

Dirksen G. Krankheiten der Bewegungsorgane. In: G. Dirksen, H. D. Gründer & M. Stöber, Hrsg. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes.* Stuttgart: Parey; 2006.S.912-78.

Downing BR, Cornwell K, Toner M, Pins GD. The influence of microtextured basal lamina analog topography on keratinocyte function and epidermal organization. *J. Biomed. Mater. Res.* 2005;72A(1):47–56.

Eckert RL, Sturniolo MT, Broome A, Ruse M, Rorke EA. Transglutaminase function in epidermis. *J Investig Dermatol.* 2005;124(3):481–92.

Eckert RL, Yaffe MB, Crish JF, Murthy S, Rorke EA, Welter JF. Involucrin--structure and role in envelope assembly. *J Investig Dermatol.* 1993;100(5):613–7.

Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3471–80.

Eichner R, Bonitz P, Sun TT. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J Cell Biol.* 1984;98(4):1388–96.

El Ghalbzouri A, Lamme E, Poncet M. Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell and Tissue Research.* 2002; 310 (2): 189–99.

Evans SM, Schrlau AE, Chalian AA, Zhang P, Koch CJ. Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. *J Invest Dermatol.* 2006;126(12):2596–606.

- French KR, Pollitt CC. Equine laminitis: glucose deprivation and MMP activation induce dermo-epidermal separation in vitro. *Equine Vet J.* 2004;36(3):261–6.
- French KR, Pollitt CC. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. *Equine Vet J.* 2004;36(3):230–5.
- Fuchs E, Byrne C. The epidermis: rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev.* 1994; 4(5):725–36.
- Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell.* 1980;19(4):1033–42.
- Fürst A. Makroskopische und mikroskopische Anatomie der Rinderklaue [Dissertation med vet]. Zürich: Univ Zürich; 1992.
- Gill EM, Straseski JA, Rasmussen CA, Liliensiek SJ, Eliceiri KW, Ramanujam N et al. Visualization of morphological and molecular features associated with chronic ischemia in bioengineered human skin. *Microsc Microanal.* 2010;16(2):117–31.
- Greenough PR. The Laminitis Syndrome. In: P. R. Greenough, C. Bergsten, A. Brizzi & C. Mülling, Hrsg. *Bovine Laminitis and Lameness.* 1 ed. London: Saunders Ltd; 2007a.S.36-54.
- Greenough PR. Microstructure and Function of the Bovine Claw. In: P. R. Greenough, C. Bergsten, A. Brizzi & C. Mülling, Hrsg. *Bovine Laminitis and Lameness.* 1 ed. London: Saunders Ltd; 2007b.S.8-28.
- Greenough PR, Vermunt JJ, McKinnon JJ, Fathy FA, Berg PA, Cohen RD. Laminitis-like changes in the claws of feedlot cattle. *Can Vet J.* 1990;31(3):202–8.
- Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2003; 44(11):1957–62.
- Hendry, Kay A K, Knight CH, Galbraith H, Wilde CJ. Basement membrane integrity and keratinization in healthy and ulcerated bovine hoof tissue. *J Dairy Res.* 2003; 70(1):19–27.
- Hinterhuber G, Marquardt Y, Diem E, Rappersberger K, Wolff K, Foedinger D. Organotypic keratinocyte coculture using normal human serum: an immunomorphological study at light and electron microscopic levels. *Exp Dermatol.* 2002;11(5):413–20.
- Hirschberg RM, Mülling CK, Bragulla H. Microvasculature of the bovine claw demonstrated by improved micro-corrosion-casting technique. *Microsc Res Tech.* 1999; 45(3):184–97.
- Hirschberg RM, Mülling CK, Budras KD. Pododermal angioarchitecture of the bovine claw in relation to form and function of the papillary body: A scanning electron microscopic study. *Microsc Res Tech.* 2001;54(6):375–85.
- Hirschberg RM, Plendl J. Pododermal angiogenesis and angioadaptation in the bovine claw. *Microsc Res Tech.* 2005;66(2-3):145–55.

Hoblet KH, Weiss W. Metabolic hoof horn disease. Claw horn disruption. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2001;17(1):111-27.

Hoedemaker M, Prange D, Gundelach Y. Body condition change ante- and post-partum, health and reproductive performance in German Holstein cows. Reprod Domest Anim. 2009;44(2):167–73.

Hohl D, Lichti U, Breitzkreutz D, Steinert PM, Roop DR. Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. J Invest Dermatol. 1991a;96(4):414–8.

Hohl D, Mehrel T, Lichti U, Turner ML, Roop DR, Steinert PM. Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. J Biol Chem. 1991b;266(10):6626–36.

Hohmann H. Untersuchungen über die Klauenlederhaut des Rindes. Monatsh Tierheilkd. 1902(13):49–96.

Houben E, Paepe K de, Rogiers V. A Keratinocyte's Course of Life. Skin Pharmacol Physiol. 2007;20(3):122–32.

Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Differences in involucrin immunolabeling within cornified cell envelopes in normal and psoriatic epidermis. J Invest Dermatol. 1995;104(3):391–5.

Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Hashimoto Y, Iizuka H. Programmed cell death in normal epidermis and loricrin keratoderma. Multiple functions of profilaggrin in keratinization. J Invest Dermatol Symp Proc. 1999;4(2):145–9.

Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. Dent Mater. 2004;20(1):12–20.

Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. Int Rev Cell Mol Biol. 2012;298:229–317.

Knott L, Tarlton JF, Craft H, Webster AJF. Effects of housing, parturition and diet change on the biochemistry and biomechanics of the support structures of the hoof of dairy heifers. Vet J. 2007;174(2):277–87.

Kristian T. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. Cell Calcium. 2004;36(3-4):221–33.

Lemper M, Snykers S, Vanhaecke T, Paepe K de, Rogiers V. Current status of healthy human skin models: can histone deacetylase inhibitors potentially improve the present replacement models? Skin Pharmacol Physiol. 2014;27(1):36–46.

Li L. Mouse epidermal keratinocyte culture. Methods Mol Biol. 2013;945:177–91.

Liebich H. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis : mit 11 Tabellen. 4. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2004.

- Lischer CJ, Ossent P. Pathogenesis of sole lesions attributed to laminitis in cattle. In: Shearer JK, Hrsg. Proceedings of the 12th International Symposium on Lameness in Ruminants; 2002 Jan 9-13; Orlando, USA. S.82-98.
- Lischer C, Ossent P. Klauenrehe beim Rind: eine Literaturübersicht. Tierarztl Prax. 1994;22(5):424–32.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. J Neurochem. 1997;69(2):581–93.
- Lulevich V, Yang H, Isseroff RR, Liu G. Single cell mechanics of keratinocyte cells. Ultramicroscopy. 2010;110(12):1435–42.
- Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011;27:441–64.
- Maierl J, Mülling C. Funktionelle Anatomie. In: Fiedler A, Maierl J, Nuss K, Hrsg. Erkrankungen der Klauen und Zehen des Rindes: Mit 12 Tabellen. Stuttgart: Schattauer; 2004:1–28.
- Marekov LN, Steinert PM. Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. J Biol Chem. 1998;273(28):17763–70.
- Markova NG, Marekov LN, Chipev CC, Gan SQ, Idler WW, Steinert PM. Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. Mol Cell Biol. 1993;13(1):613–25.
- McArt, Jessica AA, Nydam DV, Oetzel GR, Overton TR, Ospina PA. Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. Vet J. 2013;198(3):560–70.
- Medina-Torres CE, Mason SL, Floyd RV, Harris PA, Mobasher A. Hypoxia and a hypoxia mimetic up-regulate matrix metalloproteinase 2 and 9 in equine laminar keratinocytes. Vet J. 2011;190(2):54–9.
- Meloni BP, Majda BT, Knuckey NW. Establishment of neuronal in vitro models of ischemia in 96-well microtiter strip-plates that result in acute, progressive and delayed neuronal death. Neuroscience. 2001;108(1):17–26.
- Meloni BP, Meade AJ, Kitikomolsuk D, Knuckey NW. Characterisation of neuronal cell death in acute and delayed in vitro ischemia (oxygen–glucose deprivation) models. J Neurosci Methods. 2011;195(1):67–74.
- Merker HJ. Morphology of the basement membrane. Microsc Res Tech. 1994;28(2):95–124.
- Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. IUBMB Life. 2013;65(11):904–10.
- Mills JA, Zarlenga DS, Dyer RM. Bovine coronary region keratinocyte colony formation is supported by epidermal-dermal interactions. J Dairy Sci. 2009;92(5):1913–23.

Mobasheri A, Critchlow K, Clegg PD, Carter SD, Canessa CM. Chronic equine laminitis is characterised by loss of GLUT1, GLUT4 and ENaC positive laminar keratinocytes. *Equine Vet J*. 2004;36(3):248–54.

Mülling C, Budras KD. Morphology of the dermo-epidermal junction of the bovine hoof with reference to its biological function. *Wien Tierarztl Monatsschr*. 2002(89):188–96.

Mülling C. Struktur, Verhornung und Hornqualität in Ballen, Sohle und weißer Linie der Rinderklaue und ihre Bedeutung für Klauenerkrankungen [Dissertation med vet]. Berlin: Freie Universität Berlin; 1993.

Mülling C, Lischer CJ. New aspects on etiology and pathogenesis of laminitis in cattle. *Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine. Proceedings of the XXII World Buiatrics Congress*; 2002 Aug 18-23; Hannover, Deutschland.

Mülling C. Three-dimensional appearance of bovine epidermal keratinocytes in different stages of differentiation revealed by cell maceration and scanning electron microscopic investigation. *Folia Morphol (Warsz)*. 2000;59(4):239–46.

Mülling C, Bragulla HH, Reese S, Budras KD, Steinberg W. How structures in bovine hoof epidermis are influenced by nutritional factors. *Anat Histol Embryol*. 1999;28(2):103–8.

Mülling CH, Budras KD. Der Interzellularkit (Membran Coating Material, MCM) in der Epidermis der Rinderklaue. *Wien Tierarztl Monatsschr*. 1998(85):216–23.

Nebel U. In vitro Modelle proliferierender und differenzierender epidermaler Keratinozyten der Rinderklaue [Dissertation med vet]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2005.

Nemes Z, Marekov LN, Steinert PM. Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. Binding to membranes directs residue specificity. *J Biol Chem*. 1999;274(16):11013–21.

Ngo MA, Sinitsyna NN, Qin Q, Rice RH. Oxygen-dependent differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2007;127(2):354–61.

Nocek JE. Bovine acidosis: implications on laminitis. *J Dairy Sci*. 1997;80(5):1005–28.

Ossent P, Lischer C. Bovine lamninitis: the lesions and their pathogenesis. In *Practice*. 1998;20(8):415–27.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006;3(3):187–97.

Pelletier J, Bellot G, Gounon P, Lacas-Gervais S, Pouyssegur J, Mazure NM. Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival. *Front Oncol*. 2012;2:18.

- Pentland AP, Marcelo CL. Modulation of proliferation in epidermal keratinocyte cultures by lowered oxygen tension. *Exp Cell Res*. 1983;145(1):31–43.
- Peterse DJ. Laminitis and interdigital dermatitis and heel horn erosion. A European perspective. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1985;1(1):83–91.
- Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Vet J*. 2008;176(1):21–31.
- Portugal-Cohen M, Kohen R. Exposure of human keratinocytes to ischemia, hyperglycemia and their combination induces oxidative stress via the enzymes inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase. *J Dermatol Sci*. 2009;55(2):82–90.
- Poumay Y, Coquette A. Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch Dermatol Res*. 2007;298(8):361–9.
- Poumay Y, Herphelin F, Smits P, De Potter, I Y, Pittelkow MR. High-cell-density phorbol ester and retinoic acid upregulate involucrin and downregulate suprabasal keratin 10 in autocrine cultures of human epidermal keratinocytes. *Mol Cell Biol Res Commun*. 1999;2(2):138–44.
- Presland RB, Kimball JR, Kautsky MB, Lewis SP, Lo CY, Dale BA. Evidence for specific proteolytic cleavage of the N-terminal domain of human profilaggrin during epidermal differentiation. *J Investig Dermatol*. 1997;108(2):170–8.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen J. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 2008;17(12):1063–72.
- Rasmussen C, Thomas-Virnig C, Allen-Hoffmann BL. Classical human epidermal keratinocyte cell culture. *Methods Mol Biol*. 2013;945:161–75.
- Rheinwald JG, Green H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*. 1975a;6(3):317–30.
- Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975b;6(3):331–43.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Gal-Edd N, Arkin M, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. 2002.
- Ronquist G, Andersson A, Bendsoe N, Falck B. Human epidermal energy metabolism is functionally anaerobic. *Exp Dermatol*. 2003;12(5):572–9.
- Sarcev A. Etablierung eines direkten Kokultur-Modells zur Analyse der Interaktion zwischen mikrovaskulären Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten [Dissertation med vet]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2012.
- Savignan F, Ballion B, Odessa MF, Charveron M, Bordat P, Dufy B. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) and Ca^{2+} -induced differentiation in HaCaT keratinocytes. *J Biomed Sci*. 2004;11(5):671–82.

Shen S, Wertheimer E, Sampson SR, Tennenbaum T. Characterization of glucose transport system in keratinocytes: insulin and IGF-1 differentially affect specific transporters. *J Invest Dermatol*. 2000;115(6):949–54.

Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(1):80–91.

Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt5):667–75.

Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbaum T, Wertheimer E. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. *Diabetes*. 2001;50(7):1627–35.

Spurlock DM, Dekkers, J C M, Fernando R, Koltes DA, Wolc A. Genetic parameters for energy balance, feed efficiency, and related traits in Holstein cattle. *J Dairy Sci*. 2012;95(9):5393–402.

Steinert PM, Jones JC, Goldman RD. Intermediate filaments. *J Cell Biol*. 1984; 99 (1Pt2):22-27.

Straseski JA, Gibson AL, Thomas-Virnig CL, Allen-Hoffmann BL. Oxygen deprivation inhibits basal keratinocyte proliferation in a model of human skin and induces region-specific changes in the distribution of epidermal adherens junction proteins, aquaporin-3, and glycogen. *Wound Repair Regen*. 2009;17(4):606–16.

Takahashi S, Abe T, Gotoh J, Fukuuchi Y. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochem Int*. 2002;40(5):441–8.

Tarlton JF, Holah DE, Evans KM, Jones S, Pearson GR, Webster, A J F. Biomechanical and histopathological changes in the support structures of bovine hooves around the time of first calving. *Vet J*. 2002;163(2):196–204.

Tølbøll TH, Danscher AM, Andersen PH, Codrea MC, Bendixen E. Proteomics: a new tool in bovine claw disease research. *Vet J*. 2012;193(3):694–700.

Toussaint Raven E. Klauenpflege beim Rind. 1. Aufl. Landwirtschaftskammer Hannover; 1998.

Tsoi SC, Zheng J, Xu F, Kay HH. Differential expression of lactate dehydrogenase isozymes (LDH) in human placenta with high expression of LDH-A(4) isozyme in the endothelial cells of pre-eclampsia villi. *Placenta*. 2001;22(4):317–22.

Varkey M, Ding J, Tredget EE. Superficial Dermal Fibroblasts Enhance Basement Membrane and Epidermal Barrier Formation in Tissue-Engineered Skin: Implications for Treatment of Skin Basement Membrane Disorders. *Tissue Eng Part A*. 2013;20 (3-4):540-52.

Vermunt JJ. The multifactorial nature of cattle lameness: a few more pieces of the jigsaw. *Vet J*. 2005;169(3):317–8.

- Vermunt JJ. One step closer to unravelling the pathophysiology of claw horn disruption: for the sake of the cows' welfare. *Vet. J.* 2007;174(2):219–20.
- Vermunt JJ, Greenough PR. Predisposing factors of laminitis in cattle. *Br Vet J.* 1994;150(2):151–64.
- Vermunt JJ, Greenough PR. Structural characteristics of the bovine claw: horn growth and wear, horn hardness and claw conformation. *Br Vet J.* 1995;151(2):157–80.
- Watt FM. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(4):410–7.
- Watt FM, Green H. Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures. *J Cell Biol.* 1981;90(3):738–42.
- Watt FM, Green H. Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Nature.* 1982;295(5848):434–6.
- Weir L, Robertson D, Leigh IM, Panteleyev AA. The reduction of water-soluble tetrazolium salt reagent on the plasma membrane of epidermal keratinocytes is oxygen dependent. *Anal Biochem.* 2011;414(1):31–7.
- Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* 2005;288(2):369–76.
- Wilkens H. Zur makroskopischen und mikroskopischen Morphologie der Rinderklaue mit einem Vergleich der Architektur von Klauen- und Huf Röhrchen. [Habilschr. med. vet.]. Hannover: Tierärztl. Hochschule;1963.
- Yang C, Jiang L, Zhang H, Shimoda LA, DeBerardinis RJ, Semenza GL. Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming. *Methods Enzymol.* 2014;542:425–55.
- Yoneda K, Hohl D, McBride OW, Wang M, Cehrs KU, Idler WW et al. The human loricrin gene. *J Biol Chem.* 1992;267(25):18060–6.
- Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol.* 1989;109(3):1207–17.

10 Anhang

10.1 Material

10.1.1 Verwendete Reagenzien

Tab. 10.1 Reagenzien für die Kultivierung

Nährmedium	Hersteller	Bestell-Nr.
DMEM, Low Glucose, GlutaMAX™, Pyruvate (DMEM)	LifeTechnologies GmbH, Darmstadt	21885-025
DMEM, no glucose	LifeTechnologies GmbH, Darmstadt	11966-025
Fetal Bovine Serum "GOLD"	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	A15-151
DPBS, no calcium, no magnesium	LifeTechnologies GmbH, Darmstadt	14190-169
0,25%iges Trypsin-EDTA	LifeTechnologies GmbH, Darmstadt	25200056
Trypsin	Merck KGaA, Darmstadt	6502
Penicillin-Streptomycin	LifeTechnologies GmbH, Darmstadt	15140-122
Fungizone Antimycotic	LifeTechnologies GmbH, Darmstadt	15290-026
rHuEGF (EGF)	Biomol GmbH, Hamburg	50349

10.1.2 Verwendete Reagenzien für die Immunzytochemie

Tab. 10.2 Immunzytochemie

Komponente	Hersteller	Bestell-Nr.
Triton® X-100 für die Molekularbiologie	Appli Chem GmbH, Darmstadt	A4975.0100
Goat Serum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	B11-033
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	3580.1

Citronensäure	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	X863.1
Natronlauge 1N (1 mol/l)	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig	0312
bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	B2261

10.1.3 Proteindetektion

Tab. 10.3 Proteindetektion

Komponente	Hersteller	Bestell-Nr.
30% Rotiphoese	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	3029.1
70% Ethanol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	T913.2
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	9592.1
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	T116.1
Coomassieblau G250	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	9598.1
Cumarsäure	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	9908.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	D5879-1L
Essigsäure	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	6755.1
Glycerol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	7530.1
Glycin	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	3908.2
HCl 37%	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	4625.1
Isopropanol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	9866.2

Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	4227.3
Methanol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	CP43.2
Milchpulver	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	T145.2
NaCl	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	9265.1
Luminol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	4203.1
Ponceau S	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	5938.2
ProSieve Color Protein Marker	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	830537
Salzsäure (37%)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	9277.1
Sodiumdodecylsulfat 20%ige Lsg. (SDS)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	1057.1
Sodiumdodecylsulfat Pulver (SDS)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	4360.1
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	2367.3
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	4855.2
Tris HCl	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	9090.2
Tween 20	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	9127.1
Wasserstoffperoxid (35%)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	9683.4
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	4227.3

10.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 10.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Bestell-Nr.
6-Well-Zellkulturplatte	Corning Incorporated, Corning, NY, USA	353046
12-Well-Zellkulturplatte	TPP Techno Plastic Products AG, Trasading- en, CH	353043
96-Well-Zellkulturplatte	Corning Incorporated, Corning, NY, USA	353072
Zellkulturschalen (ø10 cm)	Corning Incorporated, Corning, NY, USA	353003
Serologische Pipetten: 5 mL serologische Pipette	Corning Incorporated, Corning, NY, USA	357543
10 mL serologische Pipette	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	607180
25 mL serologische Pipette	Corning Incorporated, Corning, NY, USA	357525
Pipettenspitzen: ep T.I.P.S. Standard 2 - 300 µL	Eppendorf AG, Hamburg	0030000870
10 - 200 µl Universal Pipetten-spitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	739296
200 - 1000 µl Pipettenspitze	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	740290
Einmal-Reagenzreservoirs	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	HT65.1
15 mL Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	188271
50 mL Zentrifugenröhrchen	Corning Incorporated, Corning, NY, USA	352070
BD Falcon Cell Strainer 40 µl	Becton Dickinson, Fran- klin Lakes, NJ, USA	352340
2 mL Kryoröhrchen	Corning Incorporated, Corning, NY, USA	430488

Deckgläser rund 12 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön	1001/12
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön	2406/1
Dako Pen	Dako GmbH, Jena	S2002
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH	99004
Whatman Papier	Th. Geyer AE19.1	10426994
Nitrocellulosemembran	Whatman Protran	10401396

10.3 Geräte

Tab. 10.5 Geräte

Geräte	Technische Daten	Hersteller
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Herasafe™ KSP 12	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Brutschrank	Heracell™ 240i CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hypoxie-Brutschrank	Heracell™ 240i CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zentrifuge	Heraeus™ Megafuge™ 40 R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mikroliterzentrifuge	Zentrifuge MIKRO 200 R Modell 2405 gekühlt	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Pipettierhelfer	accu-jet® pro	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim
Pipettenhalter: Mehrkanalpipette (8 Kanäle) Mehrkanalpipette (12 Kanäle)	Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, 10 - 100 µL Eppendorf Research® plus, 12-Kanal, 30 - 300 µL	Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg

Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Wasserbad	Schüttelwasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Mikroplatten-Reader	Infinite® 200 PRO Nano-Quant	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Datenanalyse-Software	Tecan Magellan™ 6 V 6.5	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Inverses Mikroskop	Axiovert 40 C	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mikroskopkamera	AxioCam 1Cc1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Bildverarbeitungssoftware	AxioVision V 4.8.0.0	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
OP-Mikroskop	J.K.H.® Fiberlight J.K.H. Power Control Unit Model 039005 J.K.H. 111-806 J.K.H. Eyepiece Okkular Nikon 10x/23 J.K.H W10X-23mm	J. K. Hoppl Corporation, New York, USA
Hybridisierungssofen mit Wipptisch	HB-1000 Hybridizer Hybridization Oven	Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge, UK
SDS-Laufkammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Tank Blot und Gelhalterkassetten	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Netzgerät	PEQLAB Power Supplies EV231	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gasdichte Spritze	SGE syringe, gas tight, 50 µL, RN	SGE Analytical Science Pty Ltd
pH-Meter	Labor-pH-Meter Lab 870	Schott Instruments Analytics GmbH, Mainz
Feinwaage	AG204 Delta Range Waage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Lumineszenz-Dokumentationssystem	Luminescent Image Analyzer CH	Fujifilm Holdings K.K., Tokio, J
Aufnahmesoftware	Image Reader LAS-1000 Pro V2.6	Fujifilm Holdings K.K., Tokio, J

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit auf verschiedensten Wegen beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. Christoph Mülling für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die vielen fachspezifischen Anregungen und konstruktiven Diskussionen, außerdem die Möglichkeit des eigenständigen und freien Arbeitens, bildeten eine produktive Basis für diese Dissertation.

Ein großer Dank geht außerdem an die Abteilung Zelltherapie des Fraunhofer-Institutes für Zelltherapie und Immunologie in Leipzig für die Kooperationsmöglichkeit. Insbesondere bei Betty Wielsch und Ina Bosse möchte ich mich für ihre großartige Unterstützung bedanken, ohne die diese Arbeit als solche nicht möglich gewesen wären.

Außerdem möchte ich mich bei allen Angehörigen des Veterinär-Anatomischen Instituts bedanken. Das Miteinander und die Hilfsbereitschaft haben mir das Promovieren sehr erleichtert. Jule Michler und Maria Schober danke ich für die Hilfsbereitschaft und kritischen Diskussionen während der vielen gemeinsamen Stunden im Labor. Bei Mondy möchte ich mich für die unzähligen Ideen und Anregungen bedanken.

Sonja Eickmann, Foelke Jürgens, Dorothea Lübbe und Linda Spädte möchte ich für das unermüdliche Lesen meiner Arbeit danken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mit viel Ruhe und Gelassenheit stets allem entgegensehen und mir immer alle Möglichkeiten und Freiheiten gegeben haben.

Diese Arbeit wurde im Rahmen der Landesinnovationspromotion durch die Sächsische Aufbaubank (Europäischer Sozialfonds ESF) gefördert.

